

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias.
Departamento de Biología Molecular

Respuesta Regenerativa Glial en el disco imaginal
de ojo de *Drosophila melanogaster*

Sergio Benjamín Velarde Rangel
Madrid, 2019

Respuesta Regenerativa Glial en el disco imaginal de ojo de *Drosophila melanogaster*

Memoria presentada por
Sergio Benjamín Velarde Rangel

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular
Madrid, 2019

Director de Tesis:
Dr. Antonio Baonza Cuenca
Tutor de Tesis:
Dr. Jose Felix De Celis Ibeas

Ευχαριστώ για την αγάπη σου τζαι την ατέλειωτη
υπομονή σου Ale...

RESUMEN / SUMMARY.	1
INTRODUCCIÓN.	9
1. Biología del desarrollo y regeneración.....	9
2. Reacción regenerativa del Sistema Nervioso. Vínculo Neurona-Glía.....	11
2.1. Células gliales. Relación intrínseca con el Sistema Nervioso.	11
2.2. Respuesta Regenerativa Glial (RRG).	12
3. <i>Drosophila melanogaster</i> . Un modelo de estudio genético.	14
4. Glía en el sistema nervioso de <i>Drosophila melanogaster</i> . Función y subtipos de células gliales.	15
5. Respuesta homeostática al daño del sistema nervioso de <i>Drosophila melanogaster</i> . Daño inducido y Respuesta Regenerativa Glial (RRG).	17
6. Discos imaginales. Sistemas modelo que facilitan el estudio de la regeneración.	18
7. Disco imaginal de ojo. Paradigma de la regeneración neuronal.....	19
7.1. Células gliales en el disco imaginal de ojo. Modelo de migración celular.	22
7.2. Control de la migración glial en el ojo. Mecanismos de interacción neurona-glía.	23
7.3. Ruta JNK y orquestación de señales regenerativas. Elementos facilitadores de la RRG en el disco de ojo.	26
7.4. Inducción de daño en el disco imaginal de ojo. Recreación de la RRG durante la reparación del tejido retinal.	26
OBJETIVOS.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1. Cultivo de <i>D. melanogaster</i>	35
2. Sistema de sobreexpresión génica.....	35
3. Líneas utilizadas.	36
3.1. Líneas <i>Gal4</i> y <i>QF</i>	36
3. 2. Líneas <i>LacZ</i> y reporteros de la actividad genética.	37
3. 3. Líneas <i>UAS</i> , <i>QUAS</i> y alelos mutantes.	38
4. Protocolo de ablación genética.....	38
5. Tinciones inmunohistoquímicas.	39
6. Adquisición y procesamiento de imágenes.	40

6. 1. Microscopía óptica.	40
6. 2. Microscopía confocal.....	40
6. 3. Procesamiento de imágenes.	40
7. Cálculo de índice glial y mitótico.	41
8. Cálculo del desplazamiento glial.....	41
9. Análisis estadístico.....	41
10. Análisis de expresión del reportero TRE-GFP en células gliales.....	41
RESULTADOS.	47
1. Respuesta del disco de ojo ante el daño producido por la ablación genética.	47
1.1. Efecto de diferentes tratamientos pro-apoptóticos en el disco imaginal de ojo.	47
1.2. Efectos del tratamiento de ablación durante diferentes momentos del desarrollo del ojo.	50
1.3. Reconstrucción del ojo después de la ablación genética.	51
1.4. La ablación de la región neurogénica del disco de ojo produce una respuesta proliferativa.....	53
1.5. Durante la reparación de la herida se incrementa el número de células gliales en el disco imaginal de ojo.....	54
1.6. Respuesta proliferativa de las células gliales ante la inducción de un daño en el disco de ojo.	57
1.7. Respuesta regenerativa glial en discos sometidos a un prolongado proceso de ablación genética.	58
1.8. La formación de la herida en el disco de ojo estimula el desplazamiento ectópico de la glía.....	59
1.9. La inhibición proliferativa de la glía reduce significativamente su número en el disco imaginal de ojo.....	60
1. 10. Actividad fagocítica de las Glías Wrapping.....	64
2. Reconstrucción del disco imaginal de ojo: Mecanismos de señalización involucrados en la proliferación y atracción de células gliales durante la reparación del disco imaginal de ojo.....	66
2.1. La señalización durante la reparación del tejido ocular en Drosophila.....	66
2.2. Efectos de la vía JNK durante la inducción de la herida en el disco de ojo y la RRG.....	66

2.3. La vía de señalización de Dpp durante la RRG.....	81
2.4. La actividad de la ruta de Hh durante la RRG.	90
2.5. Interacción entre las rutas de Dpp y Hh durante la RRG.	95
2.6. Interacción genética entre la ruta de Dpp y JNK durante la migración glial.....	100
2.7. En los mutantes hepr ⁷⁵ se inhibe el efecto migratorio y proliferativo glial causado por la activación simultánea de las rutas Dpp y Hh.	104
DISCUSIÓN.....	109
1. La ablación genética en discos de ojo desencadena una respuesta homeostática que promueve la integridad epitelial.....	109
2. Durante la reparación de la herida se activa la proliferación compensatoria y se acumulan células gliales en la región basal del disco de ojo.	111
3. Respuesta Regenerativa Glial en el disco imaginal de ojo.	112
4. La vía de la JNK facilita la migración glial en respuesta al daño. embrion	113
5. Las vías de señalización de Hh y Dpp actúan de forma sinérgica para promover la proliferación y migración glial.....	114
6. Dpp y Hh activan a la vía JNK para promover la migración glial en el ojo.....	115
7. Modelo de RRG en el disco de ojo	116
CONCLUSIONES.	121
BIBLIOGRAFÍA.....	125
ANEXO I	143
ANEXO II	147

RESUMEN / SUMMARY

La capacidad de reparar tejidos u órganos tras ser lesionados es una habilidad intrínseca de muchos seres vivos que se presenta bajo diferentes umbrales y en diversos momentos del desarrollo, y se le denomina regeneración. Algunos de los organismos que exhiben una mayor capacidad regenerativa han sido utilizados como modelos de estudio para investigar los mecanismos que controlan este fenómeno. Sin embargo, el análisis experimental de los procesos regenerativos que subyacen a la regeneración de tejidos, muchas veces se ha visto dificultado por las limitaciones experimentales que presentan estos organismos de estudio (planarias, hidras, anfibios, entre otros). Los discos imaginales de *Drosophila* son un sistema arquetipo idóneo para analizar este fenómeno. En particular, el disco imaginal de ojo nos posibilita el análisis de las respuestas homeostáticas que ocurren tras el daño al sistema nervioso, ya que es el único disco imaginal donde se origina una gran cantidad de tejido nervioso de forma independiente al resto del Sistema Nervioso Central (SNC). Esto permite analizar las consecuencias de la ablación de una región del tejido nervioso, esquivando la letalidad que podría conllevar la eliminación de una parte primordial del SNC. En esta tesis hemos empleando sistemas condicionales de expresión génica para inducir daño en la región neurogénica del disco de ojo y así poder analizar los procesos celulares que se inician cuando se produce una lesión neuronal.

Una de las consecuencias que conlleva el daño en el tejido neuronal es la activación de las células gliales que pueden mediar la remodelación estructural del tejido nervioso. Este tipo de células juegan un papel muy importante durante el desarrollo del sistema nervioso, y su función es central durante los procesos de regeneración nerviosa. La peculiar forma en la que se desarrolla el disco de ojo hace de él un modelo ideal para estudiar el comportamiento glial en respuesta al daño. En el disco de ojo las células gliales se especifican en el nervio óptico para posteriormente proliferar y migrar hacia la región del disco. De manera que, el tipo de señales que controlan su migración y proliferación deben de funcionar a larga distancia. Empleando nuestros sistemas condicionales de inducción del daño, hemos lesionado la región neurogénica del ojo y analizado el comportamiento de las células gliales. Encontramos que el daño promueve una respuesta regenerativa glial que consiste en un incremento de la migración y división glial, y la inducción de actividad fagocítica de algunas glías. Además, encontramos que las vías de señalización de Hh y Dpp funcionan simultáneamente para inducir la proliferación de las células gliales y para activar a la ruta JNK que facilita la migración glial.

SUMMARY.

Tissue and organ regeneration is a capacity of many organisms that occurs under different thresholds and at different stages of development. Some of the organisms that exhibit a greater ability to reconstruct damaged structures have been used as system models. However, the experimental analysis of the processes that underlie tissue regeneration is often limited, in part because compared with other organisms the genetic manipulation techniques available in most of the organism with high regenerative ability are scarce (planaria, hydras and amphibians, among others). The imaginal discs of *Drosophila melanogaster* are an excellent model system to discover evolutionary conserved gene function and gene networks. Considering the prevalent conservation of gene function, the results obtained in *Drosophila* have recurrently had important implications for human health. This insect has been also used to study the mechanisms involved in organ regeneration. More specifically, the imaginal eye disc allows us to analyze the homeostatic responses that occur when the nervous system is damaged. The nervous cells that form the eye discs have an origin independent of the CNS, this allows us to analyze the consequences of the ablation of a part of the tissue, avoiding the lethality caused when the CNS is damaged. In this thesis, we have used conditional gene expression systems to induce damage in the neurogenic region of the eye disc and thus examined the cellular processes involved in nervous system repair. Our results have allowed us to identify characteristic features of a regenerative response, such as: the activation of compensatory proliferation and the reconstruction of damaged tissue. One of the consequences of the damage in the neuronal tissue is the activation of glial cells that can mediate the structural remodeling of the nervous tissue. This type of cells play a critical role during the development of the nervous system, and its function is central during the processes of nerve regeneration. The unique features of the eye disc development is an ideal model to study the mechanisms activated during the glial regenerative response. In the eye disc, the glial cells are specified in the optic nerve and then they have to migrate to the disc region. During the migration process glial cells divide. Both cellular processes are regulated by signals that emanate from the eye discs region. Therefore, these signals must function at a long distance. Using our conditional systems to induce damage, we have injured the neurogenic region of the eye and analyzed the behavior of the glial cells. We have found that damage promotes a glial regenerative response that consists of an increase in migration and glial division, and the induction of phagocytic activity of some glia. In addition, we have discovered that Hh and Dpp signaling pathways function simultaneously to induce the proliferation of glial cells in the retina and to activate the JNK pathway for facilitating glial migration.

INTRODUCCIÓN

1. Biología del desarrollo y regeneración.

Todos los organismos pluricelulares se generan a partir de una célula individual a la que se le denomina huevo fecundado o cigoto. Esta célula comienza un proceso de división que da lugar a la producción de muchas células distintas. Esta condición de “multicelularidad” fue uno de los rasgos evolutivos más significativos sobre los que se constituyeron las bases de la especialización celular (donde un grupo de células logra llevar a cabo funciones más complejas gracias a que otras se hacen cargo de su soporte y nutrición). La consecuencia de esto es la formación de estructuras especializadas denominadas tejidos u órganos que configuran a un individuo adulto. En última instancia es el genoma el que orquesta mediante un estricto programa genético todo este diseño, configurando patrones biológicos de una alta complejidad y precisión. A través de la biología del desarrollo se pueden comprender cómo se llevan a cabo todos estos procesos ontogénicos (Nedelcu, 2012; Nüsslein-Volhard, 2006).

A lo largo de su vida, los organismos pluricelulares están expuestos constantemente a la destrucción de células debido al desgaste mecánico o al ataque de infecciones, también pueden sufrir la pérdida de extremidades por su interacción con otros organismos o a consecuencia de un accidente. Para hacer frente a estas agresiones que incluso podrían comprometer su supervivencia, los seres vivos cuentan con la habilidad de mantener su medio interno estable respecto al deterioro ocasionado por el entorno (homeostasis) y con la capacidad, en diferentes grados, de recuperar estructuras perdidas (regeneración) (Brockes y Kumar, 2008; Kaiser, 2001) (Figura I1).

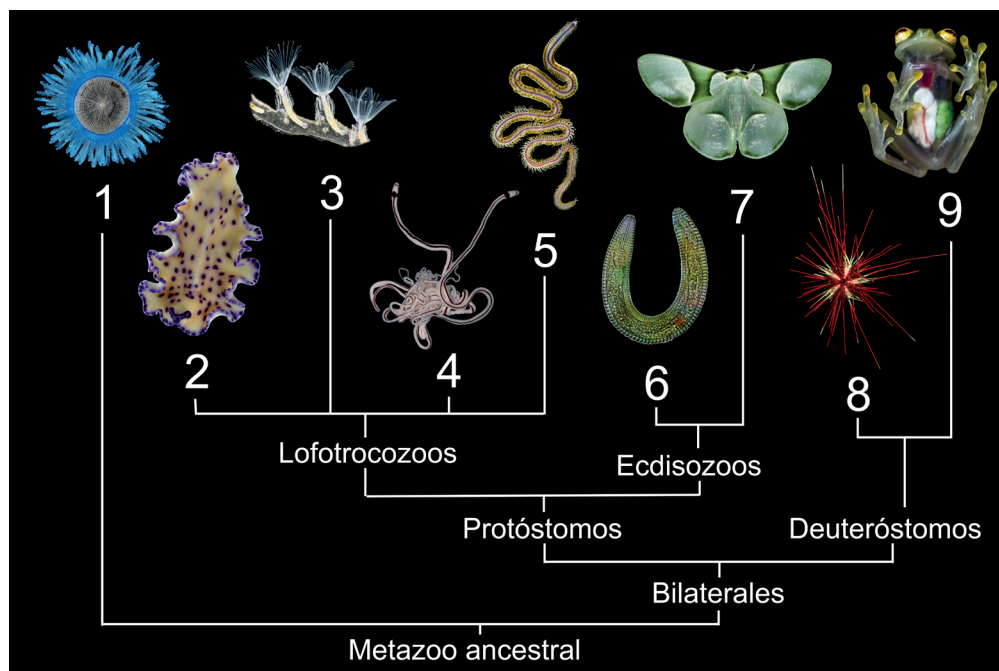


Figura I1. Los fenómenos de regeneración se manifiestan en la mayoría de los clados que componen al grupo de los metazoos. Se pueden apreciar los clados más representativos del reino animalia del que al menos se conoce un ejemplo con capacidad regenerativa: 1.- Cnidarios. 2.- Platelminfos. 3.- Briozoos. 4.- Nemertinos. 5.- Anélidos. 6.- Nemátodos. 7.- Artrópodos. 8.- Equinodermos. 9.- Cordados (Modificado de Piper, 2013).

INTRODUCCIÓN.

La regeneración es una capacidad intrínseca de los seres vivos que se presenta bajo diferentes umbrales y en diversos momentos del desarrollo. La respuesta regenerativa es necesaria para reactivar programas de desarrollo o reconstruir estructuras dañadas o perdidas y engloba una serie de respuestas y capacidades que van desde la cicatrización o cierre de una herida hasta la reconstrucción total de un órgano dañado o de un organismo completo. Los conceptos acerca de la regeneración o remodelación corporal forman parte de las ideas más antiguas que la humanidad ha desarrollado. Es por eso que el fenómeno de la regeneración se encuentra interpretado en diferentes mitologías y culturas, ya sea a través del mito griego del titán prometeo que fue condenado a regenerar su hígado cada noche después de ser devorado por el águila ethon, o mediante la representación de la deidad azteca mictlantecuhtli, labrada como una figura descarnada con una cavidad torácica de la que cuelga su hígado, símbolo de la vitalidad (ihíyotl) y la regeneración (Luján y Mercado, 1996). Sin embargo, no fue hasta el siglo XX que se demostró la capacidad regenerativa del hígado humano, confirmando las características que griegos y aztecas le habían otorgado a este órgano en sus mitologías. Por otro lado, tres siglos antes de que Antonie van Leeuwenhoek esbozara la anatomía de la hidra y de que Abraham Trembley describiera las asombrosas capacidades regenerativas de este cnidario, los aztecas ya habían observado esta propiedad en el ajolote *Ambystomamexicanum*, asociándolo con el dios xolotl, una de las deidades mexicas que se sacrificaban y renacían para provocar el nacimiento del nuevo sol y la regeneración de una nueva humanidad.

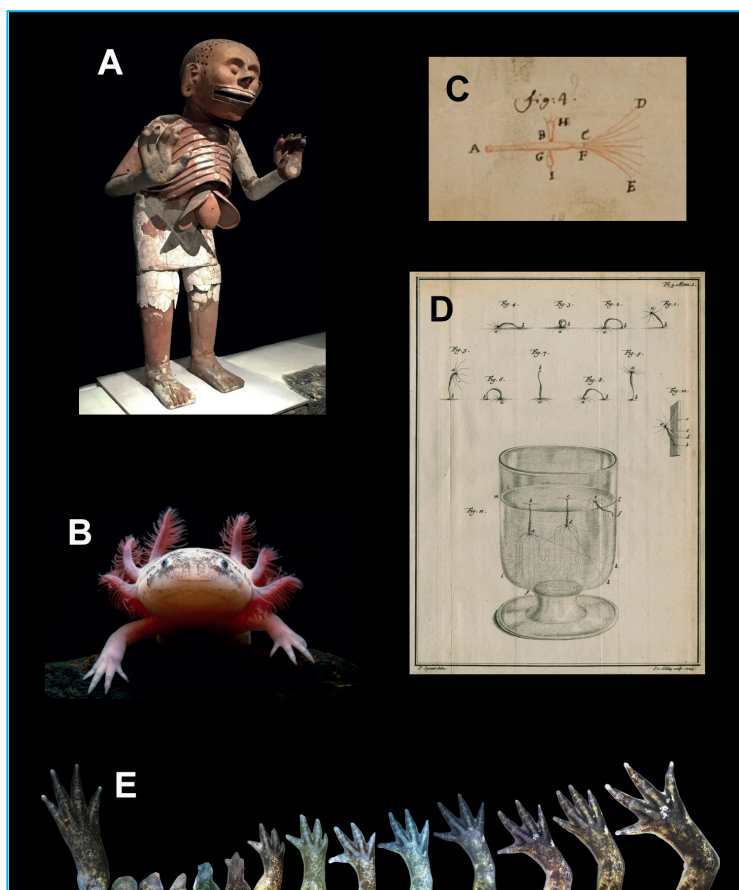


Figura 12. Interés cultural y científica por la regeneración. (A) Estatua de cerámica que representa al “señor del mictlán”, Mictlantecuhtli. Su hígado desprendido de la cavidad torácica es el símbolo de la vitalidad (ihíyotl) y la regeneración (museo del templo mayor, México). **(B)** *Ambystoma mexicanum*. Nombrado por los aztecas como axolotl (ajolote), es uno de los organismos vertebrados que se utilizan para el estudio de la regeneración. **(C)** Primera descripción de la anatomía de la hidra hecha por Antonie van Leeuwenhoek en 1702 que inspiró los primeros estudios sobre regeneración en occidente (colección de The royal society). **(D)** Estudios sobre la capacidad regenerativa de la hidra hechos por Abraham Trembley. **(E)** Representación de la regeneración gradual de una extremidad de salamandra. Crédito de foto: James Monaghan.

La complejidad y variedad de los animales en cuanto a estructuras, patrones de crecimiento, respuestas regenerativas o diseños corporales podría llevar a la conclusión apresurada de que no han sido generados por los mismos mecanismos ontogénicos. Sin embargo, uno de los mayores descubrimientos de la biología del desarrollo ha sido determinar que los procesos y vías de señalización genéticas implicados se mantienen conservados evolutivamente. Esta tendencia evolutiva facilita la utilización de varios organismos que sirven como referencia para caracterizar diversos fenómenos biológicos que luego pueden ser extrapolados a individuos más complejos o a enfermedades humanas (Holland, 1999). Dentro de los organismos más utilizados que sirven como sistemas para modelar fenómenos biológicos como la regeneración o la respuesta de un tejido ante el daño se encuentran el ratón *Mus musculus*, el pollo *Gallus gallus*, la rana africana *Xenopus laevis*, el pez cebra *Danio rerio*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, organismo elegido para el desarrollo de la presente tesis (Xu y Rubin, 1993).

2. Reacción regenerativa del Sistema Nervioso. Vínculo Neurona-Glía.

Una de las cualidades más significativas e interesantes del Sistema Nervioso (SN) es la capacidad que tiene para adaptarse y responder a una variedad de estímulos que abarcan desde las experiencias fisiológicas asociadas con el aprendizaje y la memoria hasta el deterioro ocasionado por lesiones o enfermedades neurodegenerativas. En el caso de una lesión neuronal, el SN puede reaccionar mediante la remodelación estructural del tejido. Este tipo de reacción se presenta en distintos grados dependiendo de la localización de la herida y está mediada principalmente por la participación de las células gliales. Este tipo de células juegan un papel muy importante durante el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas, así como durante los procesos de inflamación o necrosis del tejido neuronal. El desarrollo y funcionamiento normal del SN está supeditado a la estrecha asociación y dependencia que existe entre neuronas y células gliales.

La evolución del SN ha transitado desde una sencilla red de nervios hasta un complejo dispositivo informático, y es durante este proceso que las células gliales han sido determinantes. La importancia de estas células también se ve reflejada en el incremento relativo de su número y en su diversificación a lo largo de la evolución de los animales. En los organismos invertebrados representan el 10% del total de células en el SN (Freeman, 2015), mientras que en el cerebro de mamíferos la glía puede llegar a representar más del 50% del total celular nervioso (Borst, 2014; Herculano-Houzel, 2014; Klämbt, 2009).

2.1. Células gliales. Relación intrínseca con el Sistema Nervioso.

Las células gliales fueron identificadas por los neurocientíficos Santiago Ramón y Cajal, Pío del Río-Hortega y Rudolf Virchow en el siglo XIX. Descritas como células que sirven de unión entre prolongaciones axonales, se les denominó “células gliales” utilizando la palabra “glía” (del griego antiguo que significa “unión” o “pegamento”). Más de un siglo después, la gran versatilidad de funciones descubiertas en

INTRODUCCIÓN.

las células gliales ha establecido que su importancia va más allá de la de fungir como simple soporte o unión (Dimou y Jäkel, 2017; Azevedo *et al.*, 2009).

Como ya se ha mencionado, el papel que desempeñan las células gliales durante la formación y funcionamiento del SN queda de manifiesto en la diversidad de funciones que realizan. Una de las más importantes es la de regular el crecimiento axonal y la diferenciación neuronal a lo largo del desarrollo (Silies *et al.*, 2010; Lemeke, 2001; Huang *et al.*, 1998). También se les ha caracterizado como parte fundamental de la barrera hemato-encefálica, que sirve de límite entre el SN y el sistema circulatorio (Jamieson *et al.*, 2017; Awasaki *et al.*, 2008; Alcolado *et al.*, 1998). Asimismo, se les ha descrito favoreciendo las conexiones sinápticas y la red de circuitos neuronales (Pannicke *et al.*, 2016). Por último, se sabe que operan como mecanismo homeostático de defensa del SN ante daños externos e internos (Thompson y Tsirka, 2017; Cagan, 2009). Una peculiaridad del SN es que se mantiene aislado del resto del sistema circulatorio gracias a una barrera formada por células gliales y tejido endotelial (en el caso de los animales vertebrados). Por lo consiguiente, la respuesta defensiva ante el daño neuronal o el ataque de infecciones recae, en gran medida, en la actividad de la glía (Omoto *et al.*, 2016; Ronaldson y Davis, 2012).

2.2. Respuesta Regenerativa Glial (RRG).

Una de las primeras reacciones ante el daño del sistema nervioso es la activación de la glía, a este fenómeno se le conoce como Respuesta Regenerativa Glial (RRG). En concreto se ha demostrado que las lesiones al Sistema Nervioso Central (SNC) provocan que las células gliales sean capaces de: promover la fagocitosis de células afectadas, aislar la zona dañada para formar una cicatriz que evita la propagación de señales al resto del SNC, participar en la respuesta anti-inflamatoria y controlar de manera no autónoma la tasa proliferativa de otras células gliales (Rao y Rolls, 2017; Thompson y Tsirka, 2017; Losada-Perez *et al.*, 2016; Sofroniew, 2009; Lemke, 2001). En los mamíferos el SNC no se regenera después de una lesión, sin embargo, el daño induce reparaciones y respuestas regenerativas que pueden, en cierta medida, restaurar parte de la función del tejido nervioso dañado. Además, se ha descrito que la microglía y los astrocitos son las células gliales que principalmente están mediando la RRG en mamíferos. La microglía es una célula especializada en fagocitar células apoptóticas y residuos celulares que se producen tras una lesión. Por los efectos que causan se clasifican como M1 y M2: Las M1 producen efectos inflamatorios que terminan por inducir la muerte de neuronas y oligodendrocitos (Ol). Además, se ha demostrado que pueden inhibir el crecimiento axonal. Por el contrario, las M2 inducen efectos totalmente contrarios a las M1 ya que son capaces de inducir la remielinización en regiones dañadas, secretar citoquinas que disminuyen el proceso de inflamación o ayudar al proceso regenerativo axonal (Jin y Yamashita, 2016). En cambio, los astrocitos forman una cicatriz en el sitio de la lesión que limita la extensión de la herida y evita así una mayor expansión de la lesión (Liddelow *et al.*, 2017; Yiu y He, 2006). Esta cicatriz, sin embargo, inhibe el crecimiento axonal, lo que impide que se recobre la función de la región dañada (Liddelow *et al.*, 2017; Yiu y He, 2006; Silver y Miller, 2004). Tanto la microglía como los astrocitos son células que promueven principalmente la reparación

del tejido neuronal, pero a la vez inhiben la recuperación funcional (Figura I3B) (Li *et al.*, 2016; Jin y Yamashita, 2016; Herrman *et al.*, 2008; Bush *et al.*, 1999). El Sistema Nervioso Periférico (SNP) posee una capacidad de regeneración mucho mayor que la del SNC. Esto se debe en parte a la acción de células gliales que son diferentes a las que operan en el SNC. En el SNP, células como las glías envolventes olfatorias (OEG de las siglas en inglés de “olfactory ensheathing glía”) o las NG2-glía, también conocidas como células progenitoras de oligodendroitos (CPO), promueven una respuesta que puede reparar totalmente el daño y la función de la región dañada. Tras una lesión, las CPO pueden producir astrocitos y oligodendrocitos diferenciados. Las CPO y los OI son capaces de producir factores tróficos que mantienen la supervivencia neuronal. Por otro lado, los OI recién generados inducen la remielinización de los axones, manteniendo la integridad axonal y restableciendo la conducción nerviosa (Nave, 2010; Saab *et al.*, 2013; Franklin y Gallo, 2014).

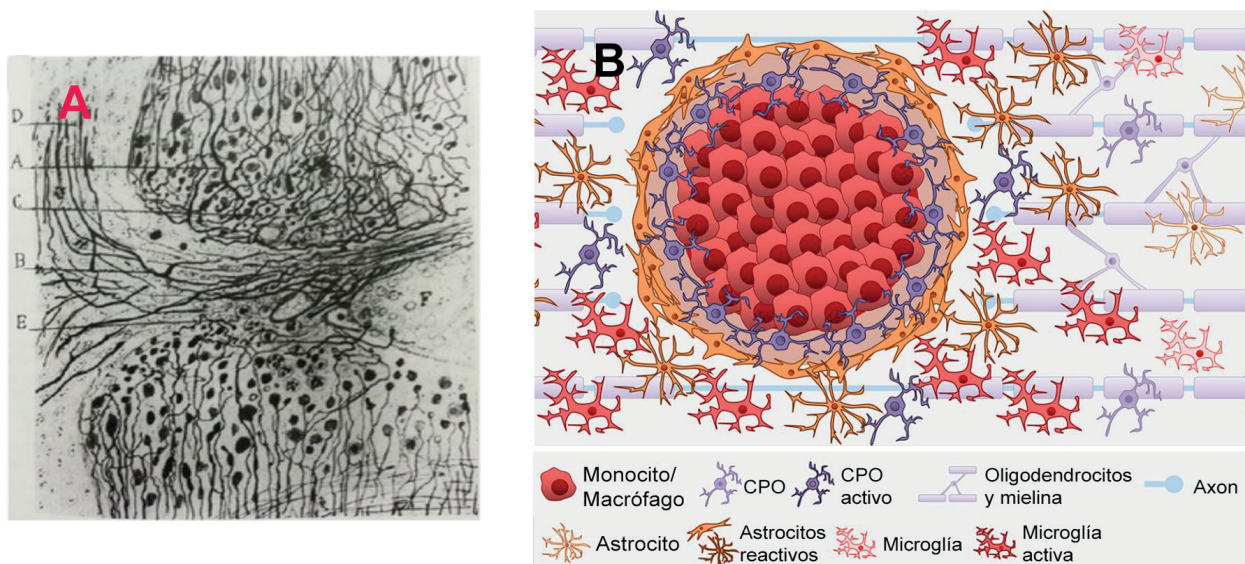


Figura I3. El daño en el Sistema Nervioso produce la activación de la glía. (A) Ilustración de Ramón y Cajal sobre una lesión por transección realizada sobre la espina dorsal, donde hacía patente la formación de pequeños bulbos de axones agrupados alrededor de la herida (Modificado de Cregg *et al.*, 2014). (B) Esquema del gradiente de activación formado en torno a la herida del SN. Los astrocitos (anaranjado) se vuelven reactivos, proliferan y contribuyen a la formación de la cicatriz glial. La Microglía y los Macrófagos (Rojo) intensifican los efectos de la “lesión secundaria” neuronal. Los CPO (morado) pueden diferenciarse en OI (violeta claro) y remielinizar, además pueden contribuir a la formación de la cicatriz y la producción de factores inhibitorios del crecimiento. Los axones (azul claro) degeneran alrededor de la lesión debido a las interacciones entre la glía y macrófagos. (Modificado de Gaudet y Fonken, 2018).

Debido al papel fundamental que tienen las células gliales durante la reparación del SN, la comprensión de los mecanismos que controlan la respuesta glial, en términos del número y tipo de células, es clave para desarrollar estrategias que promuevan la restauración del SN dañado. *Drosophila melanogaster* ha sido utilizada como una herramienta eficaz para estudiar la reacción de las células gliales cuando el SN ha sido dañado.

INTRODUCCIÓN.

3. *Drosophila melanogaster*. Un modelo de estudio genético.

La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* es un organismo de una enorme importancia para el estudio de los mecanismos genéticos que controlan el desarrollo y la regeneración. Se ha utilizado como organismo modelo en el campo de la biología y genética del desarrollo desde principios del siglo XX cuando Thomas H. Morgan lo utilizó por primera vez en su laboratorio. A lo largo de casi un siglo de experimentación y utilización como modelo biológico, la mosca de la fruta ha permitido desarrollar una gran cantidad de herramientas genéticas y moleculares (Worley *et al.*, 2012; Lawrence, 1992).

Algunas de las ventajas que ofrece este modelo son que su ciclo de vida es corto (10 días a 25°C), que su tamaño (alrededor de 4mm) facilita su almacenamiento y que genera un gran número de descendientes. Su genoma fue uno de los primeros en ser secuenciado (Adams *et al.*, 2000), con aproximadamente 14 mil genes, sólo posee 4 pares de cromosomas y presenta una escasa redundancia genética, lo que facilita el estudio de fenotipos mutantes. Cerca de la mitad de las secuencias proteicas de la mosca tiene ortólogos en los mamíferos y muchas enfermedades genéticas humanas tienen analogías modelables en *Drosophila* (Reiter *et al.*, 2001). Otras de las ventajas de trabajar con este organismo modelo son las múltiples herramientas genéticas desarrolladas para permitir el control espacio-temporal de la actividad de cualquier gen, el seguimiento de linajes celulares concretos y la posibilidad de mantener líneas mutantes durante muchas generaciones (Beira y Paro, 2016; Lawrence, 1992).



Figura I4. Ciclo vital de *Drosophila melanogaster*. Esquema representativo de las distintas fases del desarrollo de *D. melanogaster* y su duración (10 días a 25°C). Consta de una fase embrionaria, 3 periodos

larvarios, una fase de pupa en la que se lleva a cabo una metamorfosis completa y la fase adulta. Crédito de fotos: Philip Freda

Drosophila es un insecto holometábolo (con un ciclo metamórfico completo) cuyo desarrollo se divide en 3 etapas bien diferenciadas. La primera de ellas es la embriogénesis, un periodo comprendido entre la fecundación del huevo y la eclosión de la larva, con una duración de 24 horas. Durante esta etapa se especifican varios grupos celulares que formarán unas estructuras epiteliales denominadas discos imaginales. Estos tejidos son los precursores de la mayoría de los tejidos del adulto de *Drosophila*. A la embriogénesis le sucede una etapa larvaria que dura 4 días aproximadamente y se divide a su vez en 3 periodos delimitados por la muda de la cutícula. La última etapa comienza con la metamorfosis, proceso mediante el cual la mayoría de los tejidos se histolizan y reabsorben, a la vez que se generan las estructuras del insecto adulto (Figura I4) (Wolpert *et al.*, 2006; Pastor-Pareja *et al.*, 2004). Sólo el sistema nervioso y digestivo se preservan mientras que las estructuras en la cabeza y tórax se construyen a partir de los discos imaginales. En el caso del abdomen, éste se forma a partir de un grupo de células denominadas histoblastos que proliferan durante el periodo pupal (García-Bellido y Merriam, 1971). La duración de esta etapa es de 5 días en promedio y termina cuando el adulto o imago surge del pupario (cubierta protectora derivada del exoesqueleto donde se lleva a cabo la metamorfosis) (Figura I4) (Bate y Martinez-Arias, 1993; Lawrence, 1992).

4. Glía en el sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*. Función y subtipos de células gliales.

En la mosca de la fruta se han descrito, en base a su morfología, 6 tipos de células gliales. Dos de ellas tienen la función de servir como barrera hemo-encefálica (BHE) en el SN de *Drosophila*, y se les denominan: glía perineural (GP) (Figura I5 1) y glía subperineural (GSP) (Figura I5 2). Estas células están ubicadas por debajo del neurilema, que es una estructura formada por una vaina de matriz celular que rodea al sistema nervioso y probablemente sea secretada por las GP. En los animales vertebrados estas células serían equivalentes a las células endoteliales y los astrocitos que ayudan a mantener la homeostasis del SN. La BHE sirve como una frontera altamente selectiva que facilita el transporte de nutrientes, regula el balance iónico al proteger al SN de la hemolinfa rica en potasio y ejerce de barrera para sustancias tóxicas que podrían estar presentes en el sistema circulatorio (Silieset *et al.*, 2010; Auldet *et al.*, 1995). En *Drosophila* existen dos tipos de células gliales que conservan un cierto paralelismo con las células de Schwann y los oligodendrocitos de vertebrados ya que son capaces de envolver axones individuales, fascículos axonales o somas neuronales. A estas células se les conoce como glía Wrapping (GW) (Figura I5 3) y glía Ensheathing (GE) (Figura I5 4). Las GW son capaces de ramificarse y envolver una gran cantidad de fascículos axonales, mientras que las GE forman delgadas capas alrededor de los somas neuronales. Este último tipo de glía se asemeja a las células de Schwann no mielinizantes que forman las fibras de Remark en los mamíferos. A parte de funcionar como soporte y unión en el SN, las GW y GE tienen propiedades fagocíticas por lo que son capaces de eliminar neuronas o axones dañados (Matzat *et al.*, 2015; Doherty *et al.*, 2009).

INTRODUCCIÓN.

En el SNC de *Drosophila* se ha descrito otra clase de glía que muchas veces aparece asociada a las células traqueales y que presenta una gran cantidad de ramificaciones, se le denomina de la misma forma que su posible análogo en vertebrados: astrocito. También se le ha relacionado con el favorecimiento de transmisiones sinápticas y con el correcto funcionamiento neuronal (Sasse *et al.*, 2015; Ito *et al.*, 1995). Por último, se han descrito glías del córtex (Figura 17 6) que envuelven los cuerpos neuronales en el SNC, de manera similar a como lo hacen las células satélite de mamíferos que brindan protección y soporte a las neuronas ganglionares (Altenhein *et al.*, 2016; Klämbt, 2009; Spindler *et al.*, 2009; Pereanu *et al.*, 2005). Durante el desarrollo embrionario las células precursoras de la glía necesitan de la actividad del gen *glial cells missing (gcm)* y de la expresión del factor de transcripción *Reversed polarity (Repo)* para poder diferenciarse. Tras la diferenciación, las células gliales pierden la capacidad de proliferar, con la excepción de las células perineurales y las glías del córtex que conservan la capacidad de dividirse hasta la fase larvaria y adulta respectivamente (Silies *et al.*, 2010; Klämbt, 2009). Una vez que las células gliales han adoptado un perfil específico tienen que migrar al lugar donde llevarán a cabo sus funciones, el tipo de migración que realizan puede ser de forma individual como ocurre en el SNC o de manera colectiva encadenada, propia del SNP. En todos los casos dicha migración requiere de una navegación axonal precisa (Sasse *et al.*, 2015; Silies *et al.*, 2007; Crews, 1998). Un buen modelo

para estudiar el control de la migración glial se puede encontrar durante la formación del disco imaginal del ojo donde un grupo de células gliales emigra hasta ese tejido en respuesta a la inducción de señales que promueven su propagación y proliferación a lo largo de su camino.

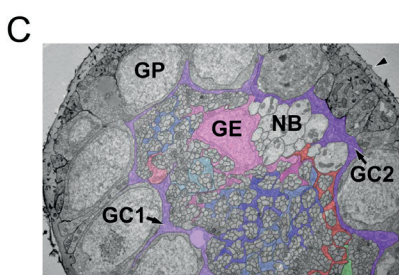
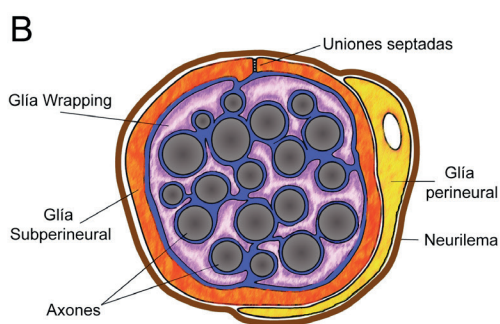
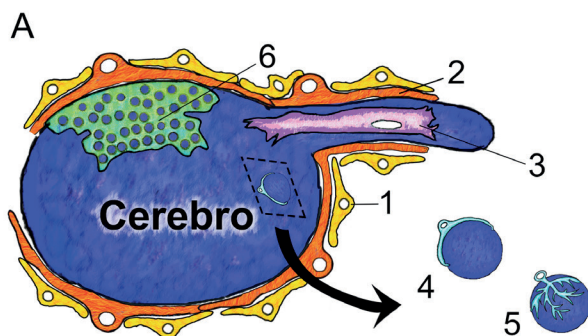


Figura 15. Morfología, subtipos y posición de la glía en *D. melanogaster*. (A) Representación esquemática del Sistema Nervioso Central (SNC) (sección transversal) y de los subtipos de glías en una larva. 1.- Glía Perineural (GP). 2.- Glía Subperineural o glía Carpet (GC) en el ojo. 3.- Glía Wrapping (GW). 4.- Glía Ensheathing (GE). 5.- Astrocito. 6.- Glía del córtex. Modificado de Freeman (2015). (B) Esquema de un nervio (corte transversal) larvario. Los axones (gris) están envueltos por las glías wrapping (violeta). La glía subperineural (naranja) constituye parte de la barrera hemoencefálica y sella conexiones intra e intercelulares mediante uniones septadas. La

capa más externa está formada por células perineurales (amarillo) y el neurilema. Modificado de Altenhein (2016). **(C)** Microfotografía electrónica del Nervio Óptico de una larva. El Nervio Óptico está rodeado por una lamela neural gruesa (cabeza de flecha). Aparecen GP con forma cuboide. Debajo de las GP hay dos GC (GC1 y GC2) que son resaltadas con sombreado de color. Estas células forman un anillo continuo alrededor del Nervio Óptico. Las proyecciones axonales del Nervio de Bolwig se reconocen por su tamaño (NB). Núcleo de una GE. Algunas proyecciones citoplasmáticas gliales envuelven axones omatidiales de manera individual (sombreados). Modificado de Silies (2007).

5. Respuesta homeostática al daño del sistema nervioso de *Drosophila melanogaster*. Daño inducido y Respuesta Regenerativa Glial (RRG).

Algunas de las reacciones que sobrevienen después del daño al sistema nervioso involucran respuestas regenerativas llevadas a cabo por las células gliales. En el caso de *Drosophila* se han desarrollado diferentes metodologías para analizar las secuelas que producen diferentes tipos de lesión tanto en el SNC como en el SNP. Para estudiar la Respuesta Regenerativa Glial en el SNC de este díptero se han desarrollado diferentes técnicas. Una las más utilizadas consiste en inducir una herida por medio de una punción en el cerebro adulto (Kato *et al.*, 2009). Otro método empleado es el pinzamiento de tejido nervioso larval “in vivo” (Losada-Perez *et al.*, 2016; Griffiths y Hidalgo, 2004). Por último, Kato *et al.*, (2011) crearon un procedimiento para inducir incisiones en tejido nervioso cultivado “in vitro”. Gracias a este tipo de estudios se ha demostrado que cuando el SNC sufre una lesión se desencadena una reparación del tejido con un patrón estereotipado que está acompañado de un incremento en la actividad y la tasa proliferativa de las células gliales. Tanto la proteína transmembranal Notch como el factor de transcripción Prospero son muy importantes durante la RRG en el SNC ya que coordinan el incremento de la proliferación y el cambio de actividad de las células gliales (Losada-Perez *et al.*, 2016; Griffiths *et al.*, 2007; Griffiths y Hidalgo, 2004). Uno de los cambios funcionales que puede ocurrir tras el daño del SN es la activación de la capacidad fagocítica de algunas células gliales. La adquisición de esta función, que ocurre tras un cambio morfológico de algunas glías, es necesaria para eliminar cuerpos apoptóticos en el SN (MacDonald *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2003). Una de las moléculas que desempeñan un papel fundamental en este proceso es el receptor Draper ya que promueve la actividad fagocítica de la glía. Se ha propuesto que este receptor se activa en algunas células gliales después de producirse un daño en el SN (Doherty *et al.*, 2014). Aunque se sabe que en la mayoría de estos procesos está involucrada la migración y proliferación de glía al sitio de la lesión, los mecanismos de los que se valen para ello no son del todo claros.

La mayoría de las aproximaciones experimentales sobre la respuesta al daño en el SNP están enfocadas al análisis de la regeneración y degeneración de prolongaciones dendríticas y axonales cuando se ocasionan lesiones por medio de laceraciones con láser (Stone *et al.*, 2010), extirpación de estructuras sensoriales (MacDonald *et al.*, 2006) o fragmentación mecánica de nervios (Fang *et al.*, 2012; Xiong *et al.*, 2010; Ayaz *et al.*, 2008). Gracias a este tipo de estudios se ha demostrado que las rutas de señalización de c-Jun N-Terminal kinase (JNK) y de PTEN-Akt están involucradas en la regeneración axonal. Sin embargo, a pesar de que algunos estudios demuestran que la glía está implicada en el

INTRODUCCIÓN.

crecimiento axonal después del daño inducido sobre neuronas sensoriales, los detalles mecánicos de cómo las células gliales regulan todos estos fenómenos aún no han sido dilucidados (Song *et al.*, 2012).

6. Discos imaginales. Sistemas modelo que facilitan el estudio de la regeneración.

La mayoría de las estructuras cuticulares en una mosca adulta provienen de los discos imaginales. Estas estructuras epiteliales tienen forma de sacos aplanados y se originan a partir de un grupo de células que provienen del ectodermo embrionario (Goto, 1997; Bate y Martínez-Arias, 1991). Las células que forman los discos proliferan durante el desarrollo larvario hasta la metamorfosis, momento en el que dan lugar a las estructuras cuticulares del adulto. La mayoría de los discos imaginales están formados por 2 capas de células indiferenciadas: una de ellas es el epitelio columnar pseudoestratificado, a partir del cual se formará la mayoría de las estructuras adultas, la otra capa está constituida por células escamosas peripodiales (membrana peripodial), necesarias para la eversión de los discos durante la metamorfosis (Beira y Paro, 2016; Pastor-Pareja *et al.*, 2004).

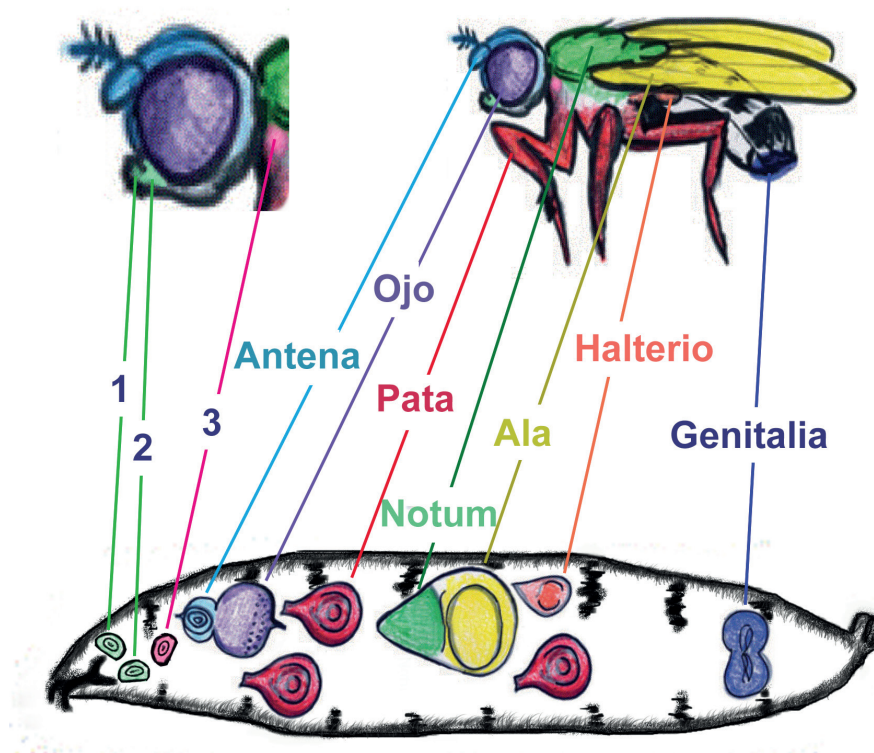


Figura I6. Discos imaginales de *Drosophila melanogaster*. Representación de los discos imaginales, y su disposición en la larva. Después de la metamorfosis, los discos imaginales darán lugar a las estructuras adultas que se muestran conectadas por líneas, con un código de colores específico. Discos imaginales: 1.- Labial. 2.- clipeolabreo. 3.- Protórácico dorsal. Modificado de Worley *et al.* (2012).

Existen 9 tipos de discos imaginales en *Drosophila*, cada uno de ellos dará lugar a estructuras independientes que se fusionarán durante la metamorfosis y formarán una cutícula continua en el adulto (Fig. I6). Los discos imaginales son de especial utilidad para el estudio del desarrollo epitelial debido a la facilidad con la que se pueden diseccionar y analizar, lo que nos da la oportunidad de observar directamente el patrón de expresión de genes que están involucrados en la morfogénesis de las estructuras que darán lugar al adulto (Beira y Paro, 2016). En los discos imaginales se pueden modelar distintos procesos celulares que ocurren durante la regeneración, así como los mecanismos que regulan la homeostasis de un tejido. Los trabajos de los investigadores Bodenstein (1943) y Hadorn *et al.* (1959) demostraron que cuando discos amputados eran implantados en larvas que se encontraban en las primeras etapas del desarrollo, o en el abdomen de hembras adultas, se incrementaba la proliferación de los discos y se restablecía el tamaño original, lo que indicaba la gran capacidad regenerativa de los discos imaginales. Únicamente cuando los discos eran transplantados en larvas que completaban la metamorfosis, ocurría el proceso de diferenciación celular. Estos experimentos permitieron demostrar que las células del disco imaginal tienen un destino celular que se especifica durante el desarrollo larvario, lo que propició el desarrollo de mapas de destino celular muy precisos de las diferentes regiones de los discos imaginales (Worley *et al.*, 2012; Bryant, 1971).

Un modelo alternativo a la técnica de trasplantes para estudiar la regeneración en discos imaginales es la ablación genética por medio del sistema Gal4/UAS/Gal80 procedente de las levaduras. Mediante este sistema se puede inducir la apoptosis en regiones muy concretas de los discos durante un tiempo limitado, tras el cual los discos entran en un periodo de recuperación (Hariharan y Serras 2017; Bergantinos *et al.*, 2010; Smith-Bolton *et al.*, 2009) (Figura M1 B). Una de las ventajas de utilizar esta técnica es que el daño se realiza *in situ*, sin necesidad de trasplantar los discos, lo que propicia que los discos sigan desarrollándose hasta formar las estructuras cuticulares del adulto. Se ha demostrado que cuando se induce daño por medio de esta técnica la proliferación celular se incrementa cerca de la región dañada, de forma similar a lo que ocurre durante la regeneración de discos que han sido amputados. Por otro lado, varios trabajos indican que tras la inducción de la ablación genética se produce un mecanismo por el cual las células vecinas migran al territorio dañado cambiando de identidad para reemplazar a las células muertas. Por lo que este sistema de inducción de heridas constituye un potente mecanismo para el estudio de las respuestas homeostáticas celulares y epiteliales (Repiso *et al.*, 2013; Herrera *et al.*, 2013). Si bien a la mayoría de los discos imaginales se les atribuyen diferentes propiedades regenerativas, el disco imaginal de ojo presenta una característica muy peculiar ya que es el único disco donde a través de un proceso neurogénico se produce una considerable cantidad de tejido nervioso. Esto permite realizar abordajes experimentales sobre la regeneración neuronal que no se pueden realizar en otros discos imaginales.

7. Disco imaginal de ojo. Paradigma de la regeneración neuronal.

El órgano visual de *Drosophila* está constituido por un ojo compuesto que está formado por alrededor de 800 subunidades independientes llamadas omatidios. Cada omatidio se compone de 8

INTRODUCCIÓN.

neuronas fotorreceptoras, 4 células cono y 2 células pigmentarias primarias que cubren al omatidio y forman la lente. Envolviendo a cada omatidio se encuentran entrelazadas un grupo de células pigmentarias secundarias y terciarias que impiden que la luz pase entre los omatidios (células accesorias) (Nérec y Desplan, 2016; Borst y Helmstaedter, 2015; Cagan, 2009).

El ojo de *Drosophila* deriva de un pequeño grupo de células que se especifican en el ectodermo embrionario y que formarán el disco imaginal de ojo-antena. Las células de este disco se subdividen en varias regiones que darán paso a 3 estructuras del adulto: la antena, la cabeza y la retina. Esto ocurre gracias a la acción jerarquizada de un conjunto de factores de transcripción que delimitan y definen la región que formarán cada región. Entre los genes implicados en este proceso se encuentran algunos miembros de la familia Pax6 como son *twin of eyeless* (*toy*) y *eyeless* (*ey*) (Davis y Rebay, 2017; Kenyon *et al.*, 2003). A estos genes se les conoce como genes maestros selectores ya que son capaces de transformar otros discos como el de ala o pata en tejido ocular (Tsachaki y Sprecher, 2012; Duong *et al.*, 2008; Halder *et al.*, 1995; Bonini y Choi, 1995; García-Bellido y Merriam, 1971).

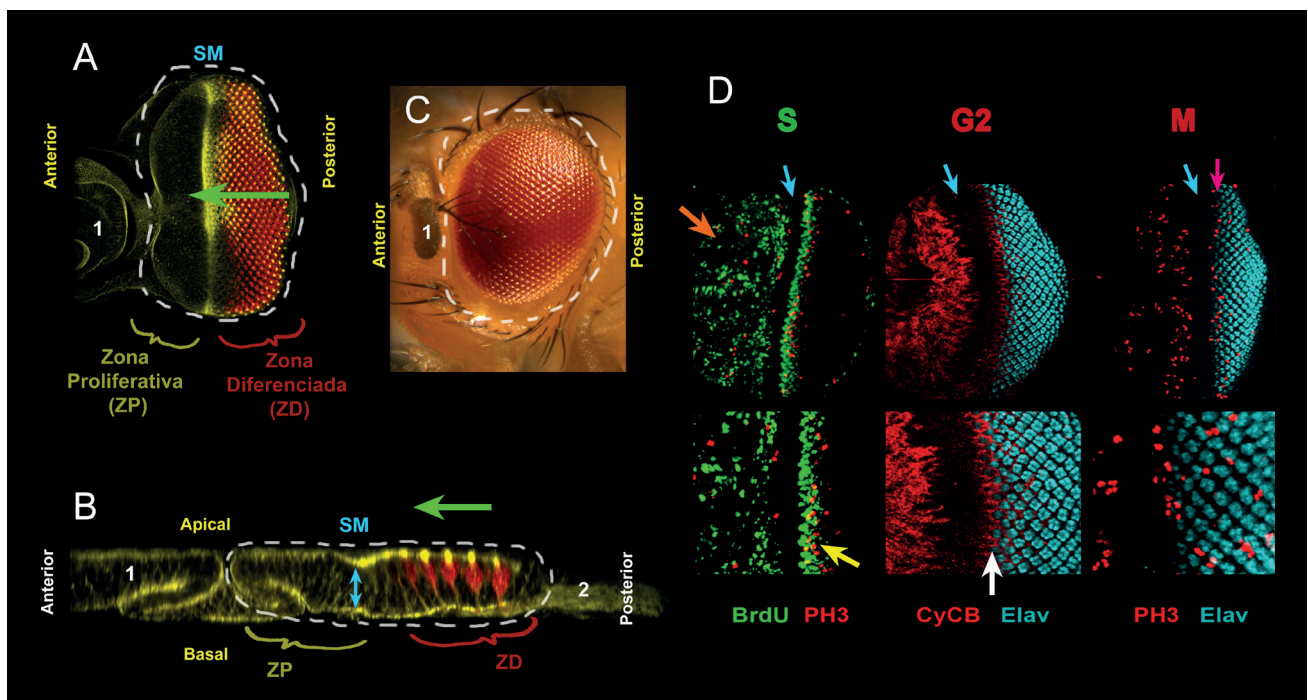


Figura 17. Morfología y desarrollo del disco imaginal de ojo. (A y B) Disco imaginal de ojo de tercer estadio larvario. **(A)** Vista apical y **(B)** corte tangencial del disco. El Surco Morfogenético (SM) se aprecia por la acumulación de filamentos de F-actina marcados con faloidina en amarillo (A) y por la constricción apical del tejido (flecha azul en B). Su formación inicia en la parte posterior del disco y se desplaza hacia la región anterior como lo indica la flecha verde. Tras su paso se aprecia un patrón de células diferenciadas teñidas con el marcador neuronal Elav en rojo que permite contrastar esta zona respecto a la Región Proliferativa sin ningún patrón aparente. 1.- Disco imaginal de antena. 2.- Nervio óptico. **(C)** Ojo de *D. melanogaster* adulta. 1.- Antena de organismo adulto. Las regiones englobadas por líneas discontinuas delimitan la región correspondiente al ojo en A, B y C. **(D)** En los discos imaginales de ojo se pueden apreciar diferentes fases del ciclo celular. La incorporación

de BrdU (verde) denota la fase S del ciclo, el marcaje de Ciclina B (CycB) en rojo indica la fase G2 y la tinción de fosfo-Histona (PH3) en rojo marca a las células en mitosis. El desplazamiento del SM marcado por la flecha azul provoca cambios en la dinámica proliferativa de las células. Antes de la llegada del SM no hay un patrón proliferativo evidente (flecha naranja). Las células en el SM (flecha azul) se detienen en la fase G1 del ciclo. Después del paso del SM algunas células avanzan coordinadamente a la fase S (flecha amarilla) y después a la fase G2 del ciclo (flecha blanca), mientras que otras se diferencian en fotorreceptores (Elav en azul). Por último, las células en fase G2 se dividen de manera coordinada por última vez (SDM) (flecha rosa). Modificado de Estella y Baonza (2015).

Los omatidios comienzan a diferenciarse al inicio del tercer estadio larvario, con la aparición del llamado Surco Morfogénico (SM) en el margen posterior del disco. El SM se forma debido a la constricción apical de las células que lo constituyen y recorre todo el primordio de ojo desde el borde posterior hacia la región anterior (Flechas verdes en Figuras I7 A y B). El paso de este surco a través del disco desencadena el proceso de desarrollo neuronal en el disco y sincroniza a todas las células en la misma fase del ciclo. De manera que adelante del SM las células proliferan sin ningún patrón, pero a medida que entran en el SM se paran en la fase G1 del ciclo celular. Tras el paso del SM, aparecen grupos de células que han salido de la fase G1, y que comienzan a diferenciarse de manera secuencial como neuronas fotorreceptoras. El resto de células que no forman parte de estos grupos avanza a la fase S del ciclo celular. Posteriormente, algunas de estas células avanzan a la fase G2 del ciclo para finalmente recibir una señal que las estimula a dividirse por última vez (flecha blanca en figura I7 D) (Sato *et al.*, 2013; Charlton-Perkins y Cook, 2010; Cagan, 2009; Greenwood y Struhl, 1999; Ready *et al.*, 1976). Esta división se conoce como segunda división mitótica (SDM) y está regulada por señales de la ruta del receptor del factor de crecimiento epidermal (“EGF” del acrónimo en inglés de “Epidermal Growth Factor Receptor”) y Notch (Fu y Baker, 2003; Baonza *et al.*, 2002), y proviene de las células adyacentes que se encuentran en proceso de diferenciación.

Una de las señales críticas para la iniciación y progresión del SM es la proteína difusible Hedgehog (Hh) (Greenwood y Struhl, 1999; Dominguez y Hafen, 1997; Heberlein *et al.*, 1993). La expresión de Hh en el margen posterior del disco marca el inicio de la progresión del SM, conforme este surco avanza, las células ya diferenciadas mantienen la expresión de esta proteína. La señalización de Hh activa la expresión de la proteína secretable Decapentaplegic (Dpp) que desempeña un papel redundante en el progreso del SM (Kenyon *et al.*, 2003; Curtiss y Mlodzik, 2000; Heberlein *et al.*, 1993). Las neuronas fotorreceptoras que van diferenciándose de manera secuencial conforme avanza el SM mandan su proyección axonal hacia diferentes regiones en el cerebro. La llegada de los axones retinales al cerebro induce la proliferación de aquellos progenitores neuronales con los que harán sinapsis una vez que estos completen su diferenciación. En este proceso la secreción de Hh juega un papel muy importante, ya que promueve la expresión del receptor de Egf (Egfr) en las células precursoras neuronales (CPN). Esto tiene como consecuencia que las CPN sean competentes para una segunda señal retinal a través de uno de los ligandos del EGFR, Spitz (Spi), asegurando la diferenciación correcta de un grupo muy concreto de neuronas (Silies *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 1998). Los axones retinales forman un andamiaje axonal en el cerebro que sirve de guía para un grupo de células fundamentales para el desarrollo y funcionamiento

INTRODUCCIÓN.

del SNC, las células gliales. Sin el contacto de los axones retinales estas células no logran diferenciarse adecuadamente y su migración dentro del cerebro es deficiente (Dearborn y Kunes, 2004).

Como en el caso de otros discos imaginales, el disco de ojo también tiene capacidad regenerativa durante el desarrollo larvario. Distintos trabajos han demostrado que cuando este disco es fragmentado y transplantado a una mosca adulta se produce un incremento en la proliferación y se recupera parcialmente del daño original (Sustar *et al.*, 2011; Lebovitz y Ready, 1986). Si el daño se induce exclusivamente en la región posterior al SM también se produce una respuesta regenerativa que consiste en un incremento de la proliferación celular. En este tipo de Proliferación Compensatoria (PC) sólo participan las células que no han comenzado el proceso de diferenciación hacia fotorreceptores (Meserve y Duronio, 2018). Una vez que se inicia el proceso de diferenciación neuronal las células pierden la capacidad proliferativa (Meserve y Duronio, 2017; Fan y Bergmann, 2008). Todo esto sugiere que en el disco de ojo existen diversos mecanismos con los que se puede hacer frente a posibles agresiones causadas en la región donde se ha iniciado el proceso de neurogénesis. Si bien se conoce el papel fundamental que desempeñan las células gliales en este tipo de procesos, se ignora cómo estas células puedan estar actuando durante la regeneración del disco imaginal de ojo.

7.1. Células gliales en el disco imaginal de ojo. Modelo de migración celular.

Además de las neuronas fotorreceptoras y las células accesorias que se desarrollan en el disco de ojo, las células gliales forman parte primordial de la estructura de este epitelio. Las glías mejor caracterizadas en el disco de ojo son las Glías Perineurales (GP), las Glías Wrapping (GW) y las Glía Subperineurales (GSP). Sin embargo, distintos trabajos entre los que podemos destacar el de (Silies *et al.*, 2007) han desvelado la existencia en el ojo de células gliales con características morfológicas muy diversas (encontrando diferencias en cuanto al número de extensiones filopódicas, la ubicación dentro de la retina o el tamaño de las proyecciones citoplasmáticas, etc.), lo que podría sugerir la existencia de nuevas clases de glías.

Las células gliales tienen un origen independiente del resto de células que forman el disco imaginal de ojo. Durante las primeras etapas del desarrollo larvario, el disco de ojo se encuentra unido al cerebro a través del nervio de Bolwig (NB) (estructura que regula el ciclo circadiano larvario) (Helfrich-Förster *et al.*, 2002). Más adelante, a inicios del tercer periodo larvario, en la región donde el nervio de Bolwig hace contacto con el cerebro, varias GP comienzan a dividirse y a migrar en cadena hacia la zona del disco de ojo (Figura I8), esta migración colectiva es muy similar al desplazamiento glial que ocurre durante el desarrollo del SNP. Las células perineurales se desplazan sobre dos glías subperineurales gigantes y aplanadas, conocidas como glías carpet (GC), que proyectan su margen citoplasmático desde el cerebro hacia la región basal del disco de ojo, reptando a través del nervio de bolwig (Figura I9 A). A medida que las glías carpet cubren el disco de ojo, el número de células perineurales se incrementa. Diferentes grupos han encontrado que la mayoría de estas células se dividen durante su trayecto a través del nervio óptico y continúan dividiéndose en el disco de ojo (Silies *et al.*, 2007; Choi y Benzer, 1994). Cuando el citoplasma de las GC hace contacto con los fotorreceptores retinales recién formados,

cerca del surco morfogenético, se establece la primer interacción neurona-glía que ocurre en el disco imaginal de ojo y provoca que las células perineurales que migran sobre las GC se detengan. El frente de avance de las células gliales coincide con el Límite Neurogénico Anterior (LNA) (figura 18 y 19). Cuando las glías perineurales llegan al LNA algunas se reprograman y diferencian como GW (Figura 19). Una vez especificadas, estas células se encargan de envolver a los axones siguiéndolos hasta la base del cerebro. Cabe recalcar que la migración de las células perineurales se puede llevar a cabo pese a la eliminación de neuronas fotorreceptoras o de las GC, por lo que los mecanismos de atracción glial no dependen exclusivamente de la interacción neurona-glía o glía-glía (Silies *et al.*, 2007; Rangarajan *et al.*, 2001; Rangarajan *et al.*, 1999). Por otro lado, si las células gliales no migran adecuadamente hacia el disco de ojo, los axones retinales no pueden proyectarse correctamente a través del Nervio óptico (Rangarajan *et al.*, 1999). Pese a los avances en el conocimiento acerca de los procesos celulares involucrados en la migración glial en el disco de ojo, los mecanismos que regulan la atracción motogénica de estas células hacia la retina sigue siendo un tema poco conocido.

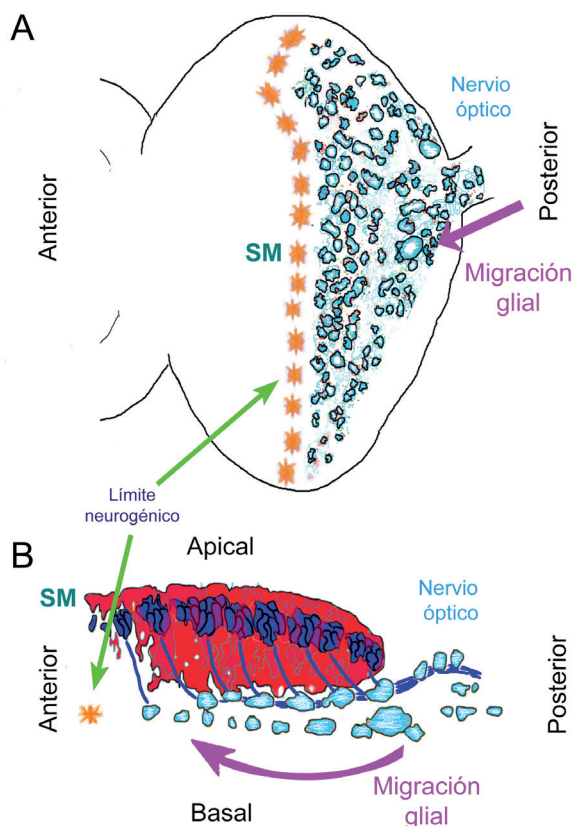


Figura 18. Migración glial en el disco de ojo. (A) Esquema de la región basal y (B) de un corte tangencial del disco ojo. Las células gliales (azul claro) entran a través del Nervio Óptico ubicado en la parte posterior del disco y se dispersan hacia la región anterior por la parte basal del disco (B). El Límite Neurogénico Anterior (LNA) está demarcado por el crecimiento de las células fotorreceptoras (asteriscos anaranjados) y el avance del SM, las células gliales no sobrepasan esta frontera durante el desarrollo normal de la larva.

7.2. Control de la migración glial en el ojo. Mecanismos de interacción neurona-glía.

7.2.1. La vía de señalización FGF promueve migración y diferenciación en la glía retinal.

Parte de los mecanismos que controlan la diferenciación y el desplazamiento glial durante el desarrollo del disco de ojo están mediados por la señalización del Factor de Crecimiento Fibroblástico ("FGF" del acrónimo en inglés de "Fibroblastic Growth Factor"). En

INTRODUCCIÓN.

Drosophila, los miembros más importantes de esta vía son los ligandos Pyramus (Pyr) y Thisbe (Ths) y el receptor Heartless (Htl). El ligando Pyr promueve la proliferación y el desplazamiento glial al unirse al receptor Htl. Esta unión promueve la adhesión entre GP y GC durante la migración glial hacia el disco de ojo, esto se debe a que la activación de Htl regula la actividad de la GTPasa RAP1. RAP1 es una enzima involucrada en muchos procesos que controlan la unión celular, la polaridad celular y la formación de uniones adherentes (Matthijs *et al.*, 2007). Por otro lado, Ths detiene la migración y promueve la diferenciación de las células gliales al unirse al receptor Htl. Lo que hace este ligando es promover la expresión de un regulador negativo de la vía, Sprouty (Sty). La disminución de la actividad de Heartless trae como consecuencia la interrupción de la migración y la inducción de la diferenciación glial (Sieglitz *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2012; Franzdóttir *et al.*, 2009). En vertebrados, un proceso similar se lleva a cabo cuando la activación secuencial de este receptor Tirosina-Quinasa orquesta la proliferación, migración y diferenciación de las células de Schwann (Michailov *et al.*, 2004; Garratt *et al.*, 2000).

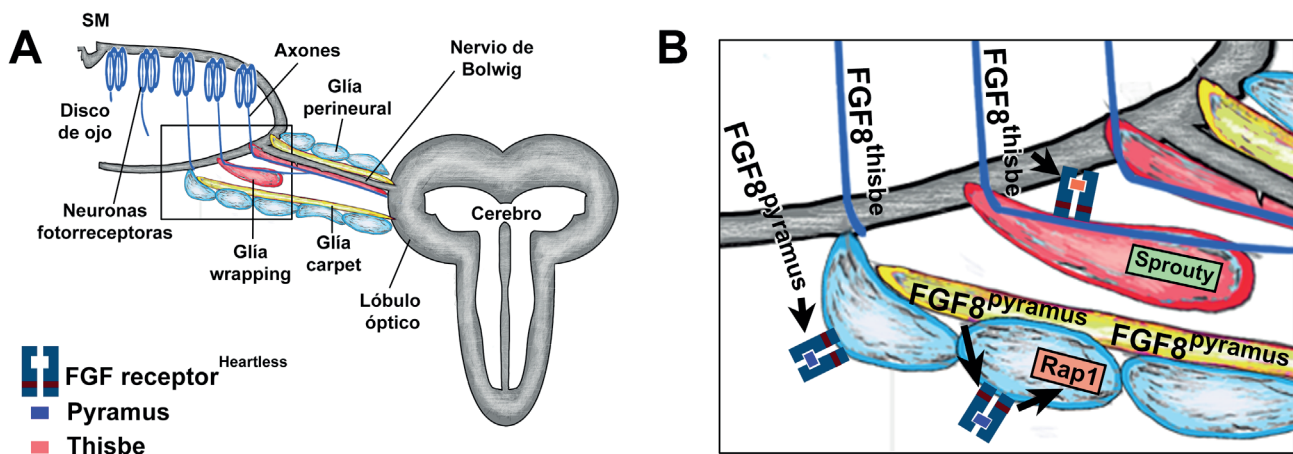


Figura 19. Papel de la vía FGF durante el desarrollo y la migración glial en el disco de ojo. La vía del FGF promueve una migración coordinada de las células gliales que coincide con la formación de las células fotorreceptoras en el disco de ojo. Las glías carpet (GC) (amarillo) se originan en el cerebro y crecen con dirección a la zona basal del disco de ojo. Las glías perineurales (GP) (azul claro) avanzan sobre la proyección citoplasmática de las GC. La GC expresa el ligando Pyr que activa al receptor Htl localizado en la membrana de las GP. Esta unión promueve la adhesión entre ambas glías, por medio de la regulación de la actividad de RAP1. Esta GTPasa regula la unión y polaridad celular. El acercamiento de las GC a los axones retinales provoca que las GP entren en contacto con otro ligando de la vía, Ths, esto provoca que las GP expresen el regulador negativo de la vía Sty, deteniendo la migración y desencadenando la diferenciación glial.

7.2.2. Control de la migración y proliferación glial a través de las rutas Hedgehog (Hh) y Decapentaplegic (Dpp).

La migración celular es un fenómeno complejo que requiere de la expresión de moléculas que induzcan una correcta direccionalidad y motilidad celular. En la retina se sabe que la migración de las células gliales está mediada por rutas de señalización que se activan en el disco imaginal de ojo y promueven funciones motogénicas o atrayentes. Existen indicios de que las rutas de señalización de Hh y de Dpp están regulando la migración y proliferación glial durante el desarrollo del disco (Hummel *et al.*, 2002; Rangarajan *et al.*, 2001).

La vía de Hh regula múltiples mecanismos celulares, tales como la proliferación celular, la angiogénesis, la formación de patrón celular o la direccionalidad axonal (Lee *et al.*, 2016; Yam y Charron, 2013; Ingham *et al.*, 2011). Además se le ha relacionado con la respuesta regenerativa de órganos como la vejiga, el corazón o la aleta (Wang *et al.*, 2015; Wehner y Weidinger, 2015; Shin *et al.*, 2011; Yam *et al.*, 2009). Los componentes canónicos de la ruta de Hh en *Drosophila* son: el ligando Hh, el receptor de membrana Patched (Ptc), la proteína G acoplada a receptor Smoothened (Smo) y el factor de transcripción Cubitus interruptus (Ci). La proteína transmembranal Ptc funciona como receptor de la vía Hh. En presencia de Hh, la actividad de Ptc se reprime. Este receptor actúa como regulador negativo de Smo por lo que la unión entre Hh y Ptc desencadena la activación indirecta de la proteína Smo que a su vez activa a Ci, éste último actúa como activador transcripcional de genes diana de la vía. Otros elementos importantes de esta ruta son las proteínas Costal2 (Cos2) y Fused (Fu) que forman un complejo proteico que regula tanto la actividad de Ci como la de Interference Hedgehog (Ihog), una proteína de membrana que favorece la unión entre Hh y Ptc (Ingham *et al.*, 2011; Hooper y Scott, 2005).

La ruta Dpp es otra de las vías que se han propuesto como reguladoras de la migración y proliferación glial durante el desarrollo del disco de ojo. Dpp es un ortólogo de la proteína secretable de mamíferos BMP/TGF β (Padgett *et al.*, 1987). Esta ruta está implicada en la regulación del crecimiento de los discos imaginales y en la progresión del surco morogenético en el disco de ojo. La manera canónica en cómo este morfógeno transmite su señal es mediante la unión a los receptores serina treonina quinasa tipo I Thickveins (Tkv) y tipo II Punt (Put). Una vez que el ligando se une a ambos receptores provoca que Put fosforile a Tkv, lo que desencadena la fosforilación del factor de transcripción Mother against dpp (Mad). Mad fosforilado entra al núcleo, y junto a la proteína Schnurri (Shn) impiden la actividad del represor transcripcional Brinker (Brk). Esto promueve la expresión de genes diana de la vía (Hamaratoglu *et al.*, 2014; Shen y Dahmann, 2005; Rangarajan *et al.*, 2001; Campbell y Tomlinson, 1999; Jaźwińska *et al.*, 1999). Esta ruta también ha sido relacionada con la maduración de células gliales que son necesarias para que las neuronas fotorreceptoras proyecten sus axones de manera adecuada en el cerebro (Yoshida *et al.*, 2005).

Las evidencias más claras sobre el papel de las rutas Hh y Dpp en la migración glial durante el desarrollo del disco de ojo las aportan los investigadores Rangarajan *et al.* (2001). Ellos han propuesto que cuando se elimina de forma simultánea la ruta Hh y Dpp se produce una fuerte reducción del número de células gliales, que es mucho mayor a la encontrada en clones mutantes individuales para cada una

INTRODUCCIÓN.

de estas vías. Además, han demostrado que cuando se sobre-expresa *hh* en regiones anteriores al SM, las células gliales pueden traspasar el LNA y migrar hacia las células que expresan estos altos niveles de Hh. Este efecto se produce sin un incremento del número total de células gliales, lo que sugiere que Hh es necesario para promover la migración, pero no la proliferación glial. Por otro lado, la expresión ectópica de *dpp* en el disco de ojo es suficiente para incrementar el número de células gliales y alterar el proceso de migración (Yuva-Aydemir *et al.*, 2011).

7.3. Ruta JNK y orquestación de señales regenerativas. Elementos facilitadores de la RRG en el disco de ojo.

Un elemento común en muchos fenómenos regenerativos es la activación de la ruta c-Jun N-terminal kinase (JNK). Ya se ha mencionado que cuando se induce daño en el sistema nervioso, la respuesta habitual en la zona de la herida es la activación de la vía JNK para regular la regeneración de prolongaciones axonales dañadas (Soares *et al.*, 2014; Klinedinst *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2010; Ayaz *et al.*, 2008). Además se conoce que esta vía ejerce efectos tanto neuroprotectores como neurodegenerativos en respuesta al daño neuronal (Massaro *et al.*, 2009; Saura *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2001; Walton *et al.*, 1999; Hafezi *et al.*, 1997). Por otro lado, recientemente se ha demostrado que esta vía también es capaz de regular la activación de la fagocitosis en células gliales (Lu *et al.*, 2017). Estos indicios sugieren que esta ruta podría estar participando durante la respuesta regenerativa del sistema nervioso.

En *Drosophila* la vía JNK se activa cuando el ligando Eiger (Egr), homólogo del factor de necrosis tumoral de vertebrados (TNF, del acrónimo en inglés de “Tumor Necrosis Factor”), se une a su receptor Wengen (Wgn). Esto desencadena la activación sucesiva de diferentes MAP-quinasas (del acrónimo en inglés de “Mitogen Activated Protein”) mediante fosforilaciones en cascada. En *Drosophila* una de las quinasas más importantes de esta ruta es la codificada por el gen *basket* (*bsk*). Esta quinasa necesita ser activada por la JNKK Hemipterous (Hep), la cual a su vez responde ante la activación de diversas JNKKK, tales como dTak1 (del nombre en inglés; TGF-B-activating Kinase 1) o Wellenda (Wnd), un mediador de la degeneración y regeneración axonal durante el daño del SNC. La consecuencia final de la fosforilación en cascada de las MAP-quinasas es la activación de Bsk. Esta proteína es capaz de activar a los factores de transcripción Jun y Fos (en *Drosophila* Jun-related Antigen y Kayak respectivamente) que regulan, en forma de heterodímeros, la transcripción de diversos genes diana (a este complejo heterodimérico se le conoce como proteína activadora 1 o AP-1). Uno los genes diana de la vía es *puckered* (*puc*), una fosfatasa que actúa como regulador negativo al desfosforilar a Bsk.

7.4. Inducción de daño en el disco imaginal de ojo. Recreación de la RRG durante la reparación del tejido retinal.

En los últimos años el disco de ojo ha sido utilizado para analizar los mecanismos que regulan la migración de la glía durante el desarrollo. Muchos estudios en este sistema modelo han contribuido

a descubrir los mecanismos básicos que conectan el desarrollo neuronal y glial con el sistema de señalización de largo alcance involucrado en estos procesos. Sin embargo, la respuesta regenerativa de la glía en los discos de ojo sigue siendo un tema poco conocido. El desarrollo tan peculiar del disco de ojo lo convierte en un modelo ideal para estudiar cómo estas señales pueden promover y controlar la respuesta regenerativa glial. Como se ha mencionado anteriormente, las células gliales de los discos oculares se originan en el nervio óptico y pueblan el disco de forma estereotipada, por lo que el número de células gliales es predecible durante el desarrollo del disco. De tal forma que cualquier cambio en la tasa proliferativa o en la migración glial, como respuesta al daño en el disco, es fácilmente detectable. La migración glial que se realiza en el disco de ojo ocurre de manera encadenada, similar a la migración que ocurre en el SNP. Pese a que la glía que va a poblar la retina provenga del SNC. Esta cualidad vuelve aún más relevante su estudio, ya que la capacidad regenerativa del SNP es mayor que la del SNC. Por otro lado, el análisis de la RRG en el disco de permite dañar un tejido neuronal que se origina de manera independiente al resto del SNC, lo que implica que no se compromete la integridad del organismo.

El estudio de los fenómenos de migración glial en el disco de ojo puede ser de gran utilidad para comprender diferentes enfermedades humanas que son provocadas por anomalías en el desplazamiento de las células gliales. Ejemplo de ellas son las neoplasias intracraneales como los astrocitomas, que pueden llegar a ser mortales debido a que la glía se dispersa fácilmente por todo el cerebro. Asimismo, los procesos regenerativos que se activan frente a una lesión del SNC pueden verse obstaculizados por una cicatriz glial, que se forma gracias a la migración de los astrocitos hacia la zona de la herida, donde dichas células proliferan y evitan la propagación de señales que promueven el sobrecrecimiento axonal. El estudio de la RRG en el ojo de *Drosophila* puede ayudar a entender cómo se regula la migración glial durante la respuesta al daño del sistema nervioso y por ende facilitar el tratamiento de varios desórdenes neuronales (Sofroniew, 2009; Correa-Cerro y Mandell, 2007). El objetivo general de la presente tesis es definir la RRG en el disco de ojo y estudiar los mecanismos que regulan esta respuesta.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis ha sido el utilizar el disco imaginal de ojo como modelo para analizar los mecanismos que pueden estar regulando la Respuesta Regenerativa Glial (RRG). Específicamente enfocamos el análisis en el control de la activación glial a larga distancia. Para ello, hemos dañado la región de la retina de los discos de ojo de *Drosophila* y hemos definido las características generales de esta respuesta y las rutas de señalización que pueden estar controlándola.

Los objetivos específicos fueron:

1. Estudiar la capacidad de reparación del disco ante la ablación de la zona neurogénica
2. Definir el comportamiento de las células gliales cuando la región de la retina es dañada
3. Identificar vías de señalización que se activan en respuesta al daño de la retina
4. Caracterizar la función de las vías de señalización que se activan para regular la RRG cuando la región de la retina es dañada

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de *D. melanogaster*.

Las diferentes estirpes que se utilizaron durante el desarrollo de la tesis se mantuvieron en 3 tipos de cámaras termorreguladas a 17°C, 25°C y 29°C según fuera el caso. El medio alimenticio de cultivo estándar se prepara a partir de harina, glucosa, agar, levadura y ácido propiónico.

2. Sistema de sobreexpresión génica.

Esta técnica permite la expresión de productos génicos bajo el control de regiones promotoras de genes endógenos. Existen 2 elementos principales en este sistema: un componente denominado trans-activador (TA), cuyo patrón de expresión se encuentra regulado por la región promotora de un gen específico, y un componente génico que se expresa bajo el control de secuencias activadoras (SA) a las que se unen específicamente los TA (Figura M1A).

Uno de los sistemas de expresión génica más utilizados en *Drosophila* es una técnica desarrollada por Brand y Perrimon (1993) a partir de genes de levadura. Su uso en la mosca permite dirigir la expresión de genes efectores que estén bajo el control de SA, denominadas *UAS* ("Up-stream Activating Sequence"). El elemento TA en este sistema es la proteína *Gal4* que reconoce las secuencias *UAS* y se une a ellas promoviendo la transcripción de genes efectores localizados en posición 3' a dichas secuencias (Figura M1 B). En este sistema la activación del gen *Gal4* está regulada por la región promotora de un gen endógeno en concreto, de tal forma que la expresión de *Gal4* reproducirá el patrón de expresión de dicho gen. Existe un refinamiento de esta técnica que consiste en el control temporal de la transcripción de genes regulados por la secuencia *UAS* mediante el uso de un represor de la actividad de *Gal4*. A dicho represor se le denomina *Gal80TS* y tiene la peculiaridad de ser sensible al incremento de temperatura, en concreto la proteína no es funcional a 29°C. El control espacio-temporal de esta técnica radica en la utilización de un promotor ubicuo que dirija la expresión del represor *Gal80TS* (por ejemplo *tubulina-Gal80TS*) para controlar, mediante la manipulación de la temperatura, la expresión de genes efectores en regiones específicas del organismo y en el momento que se deseé.

Existe un sistema de expresión alternativo desarrollado a partir del hongo *Neurospora crassa* donde se emplean los elementos *QF/QUAS/QS* (Figura M1 D) (Potter *et al.*, 2010). En este sistema la proteína *QF* actúa como la TA, las secuencias activadoras son denominadas *QUAS* y el elemento represor es el *QS*, cuya actividad se puede reprimir en presencia de ácido quínico.

MATERIALES Y MÉTODOS.

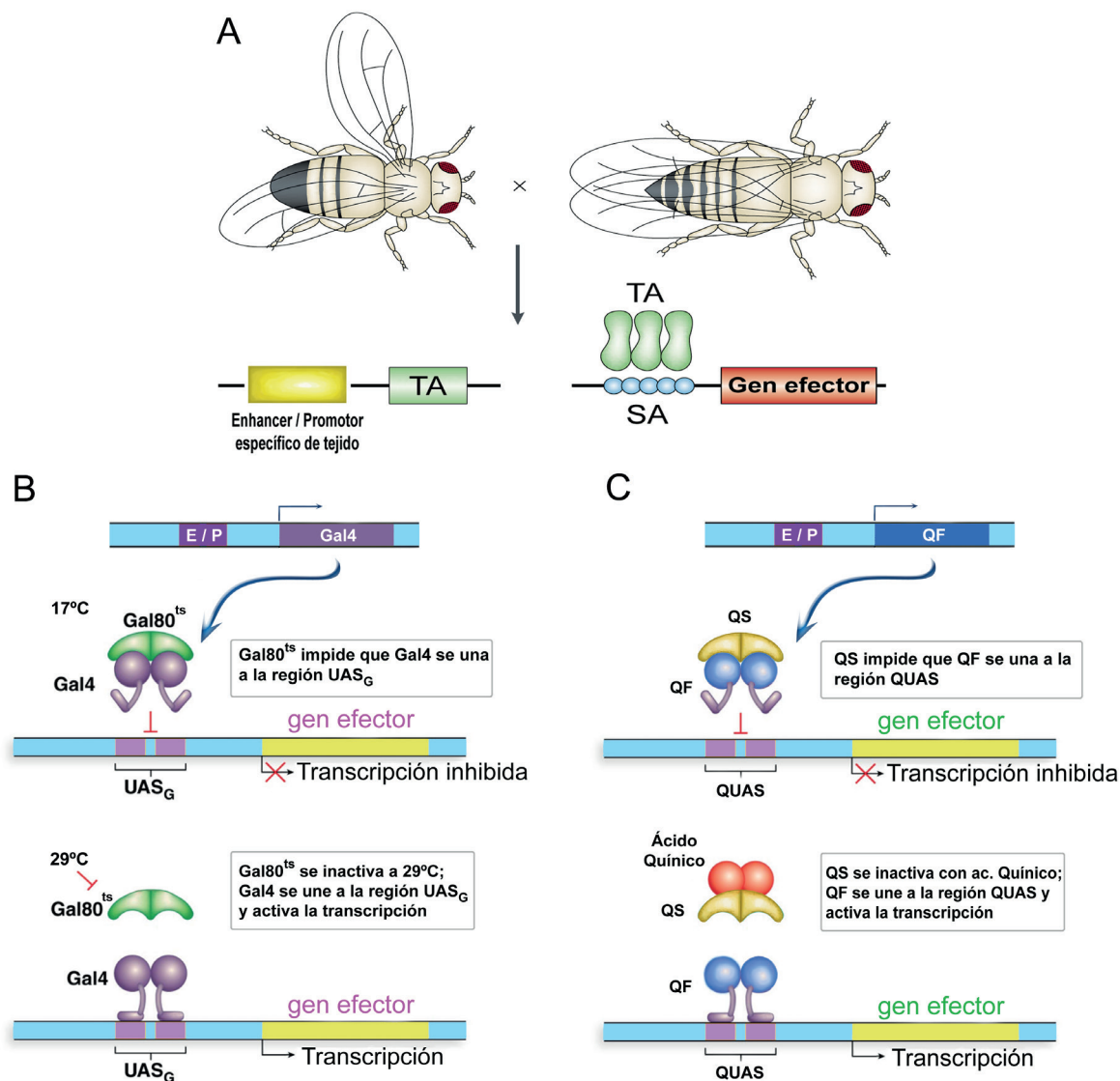


Figura M1. Sistemas de expresión génica. (A). Esquematación de la actividad de los sistemas de expresión génica en *Drosophila*, en donde se utilizan 2 elementos: el primero es un trans-activador (TA) que está bajo el control de enhancers y/o promotores. El segundo elemento es el gen efector específico que se requiere sobreexpresar bajo el control de una secuencia activadora (SA) a la que se une el TA. Sólo cuando un individuo portador del elemento TA se cruza con el portador del elemento SA se genera una progenie que contiene ambos elementos y que es capaz de sobreexpresar el gen efector. Este sistema puede ser refinado al añadir un elemento represor que puede ser modulado por el experimentador. **(B-C)** Esquemas de los sistemas Gal4/UAS/Gal80 (B) y QF/QUAS/QS (C). En el primer caso la proteína Gal80^{ts} funciona como represor de Gal4 y puede ser regulada mediante la temperatura (B), mientras que en el segundo sistema la proteína QS es la represora y puede ser modulable cuando se añade ácido quínico a la alimentación (C).

3. Líneas utilizadas.

3.1. Líneas Gal4 y QF.

Se utilizaron diferentes estirpes en donde la proteína Gal4 es expresada bajo diferentes promotores genéticos. Las líneas Gal4 utilizadas fueron las siguientes: *GMR-Gal4* (Figura M2 A), *repo-Gal4* (Figura M2 B), *hh-*

Gal4 (Tanimoto *et al.*, 2000), *ey-Gal4*, *elav-Gal4*, *mz97-Gal4* y *GMR-QF* (Potter *et al.*, 2010)

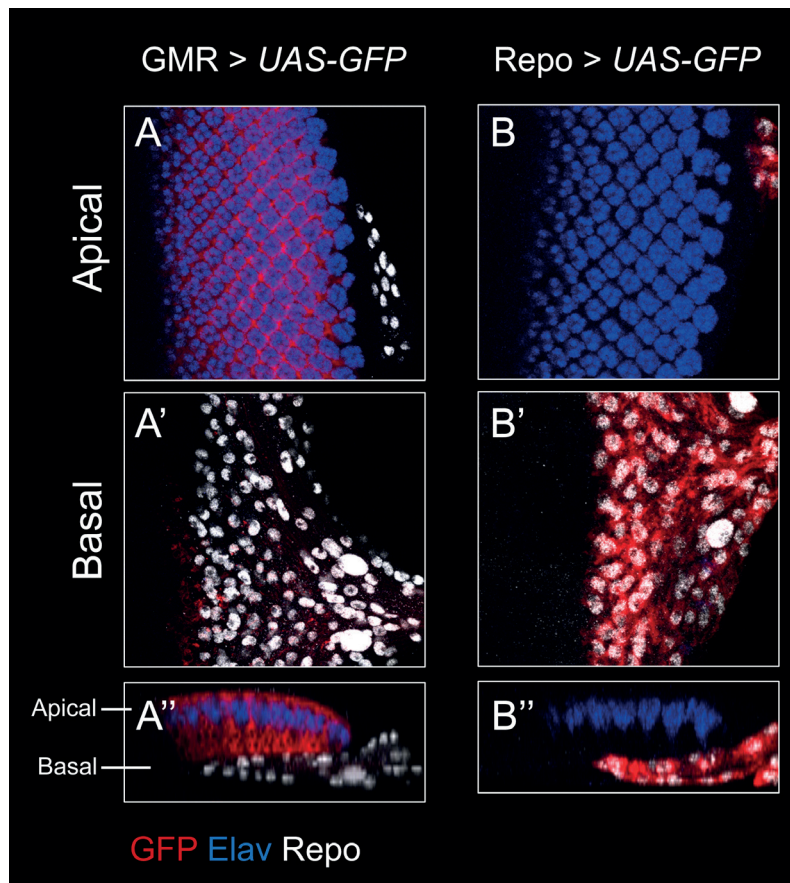


Figura M2. Patrón de expresión en el disco imaginal de ojo y las células gliales con las líneas *GMR-Gal4* y *repo-Gal4*. (A-B) Discos teñidos con el marcador neuronal Elav en azul y el marcador glial Repo en blanco. (A-A'') *GMR-Gal4* sólo se expresa en la región posterior del disco de ojo donde las células están diferenciadas (A y A'). Las células gliales, ubicadas en la región basal del disco, no presentan ningún tipo de expresión de la proteína fluorescente (rojo) (A'). (B) Cuando se usa *repo-Gal4* la expresión se restringe exclusivamente a las células gliales (B' y B'') en la zona basal del disco. Las neuronas fotorreceptoras en azul no presentan ninguna expresión de la proteína fluorescente (rojo) (B).

3. 2. Líneas LacZ y reporteros de la actividad genética.

Para estudiar el patrón de expresión de los distintos genes, se utilizaron líneas que expresaban el gen bacteriano *lacZ* bajo distintos promotores genéticos. Estas líneas fueron: *puc2B-LacZ*, *dpp-LacZ*, *hh-LacZ*.

Una forma de monitorizar la actividad de la ruta JNK es a través de las construcciones genéticas *TRE-GFP* y *TRE-RFP* que evidencian la actividad de la AP-1 Jun/Fos. El elemento principal de esta construcción son los sitios en el ADN a los que se une el heterodímero Jun/Fos cuando la vía JNK está activada. Estos sitios son regiones promotoras conocidas como TRE (por su nombre en inglés: "Tetradecanoylphorbolacetate response element") que fueron clonadas como elementos reguladores *cis* del gen reportero eGFP (Chatterjee y Bohmann, 2012).

3. Líneas UAS, QUAS y alelos mutantes.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se emplearon las siguientes líneas *UAS*: *UAS-GFP*, *UAS-mCD8-GFP*, *UAS-rpr*, *UAS-diap¹*, *UAS-micro^{RGH}*, *UAS-dronc¹*, *UAS-RBF²⁸⁰*, *QUAS-rpr* (Potter et al., 2010). Todas las líneas están descritas en FlyBase (<https://flybase.org>). En cuanto a la activación ectópica o inhibición de diferentes rutas de señalización se generó la siguiente línea: *w*; *GMR-Gal4*, *tub-Gal80TS/CyO* para cruzarse con los siguientes elementos:

Vía Dpp: *UAS-brk*, *UAS-dpp*, *UAS-tkv^{DN}*, *UAS-dpp^{ARNi33618}*, *UAS-dpp^{ARNi}*, *UAS-tkv^{QD}*

Vía JNK: *UAS-hep^{CA}*, *UAS-bsk^{DN}*, *UAS-egr* (Moreno et al., 2002), *UAS-egr^{ARNi}*

Vía Hh: *UAS-hhGFP* (Isabel Guerrero), *UAS-ihog*, *UAS-hhi*, *UAS-hh^{TS}*,

Los alelos mutantes utilizados fueron: *hep^{r75}* (Glise et al., 1995), *egr¹* y *egr³* (Igaki et al., 2002).

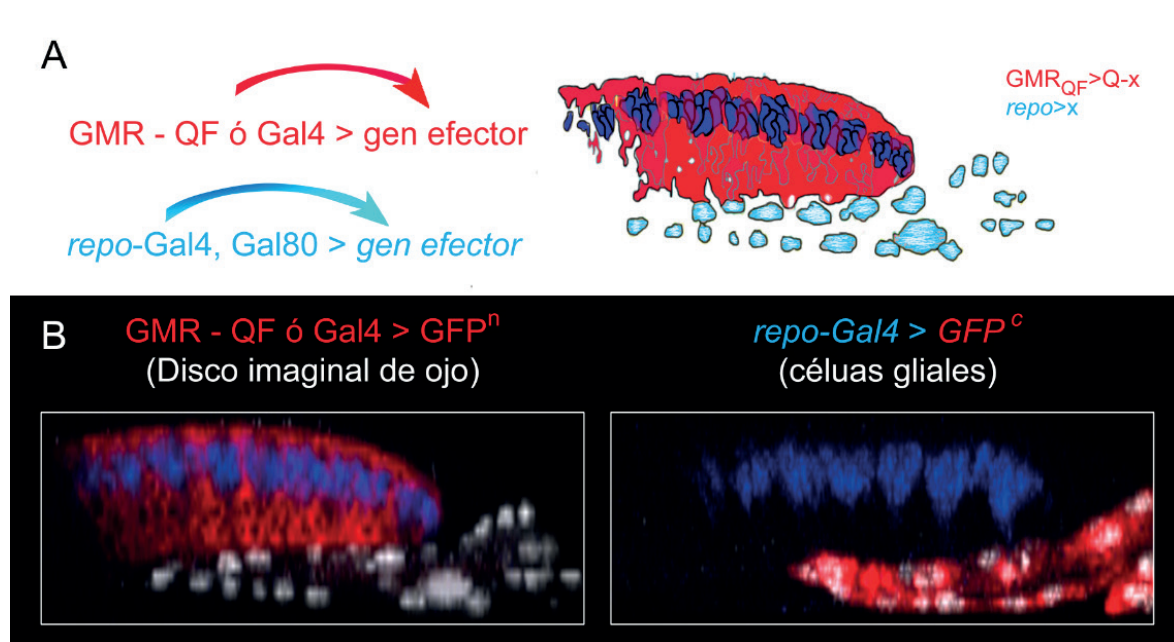


Figura M3. Expresión simultánea de dos sistemas de expresión génica. (A-B) Representación de la expresión coordinada de los sistemas *Gal4/UAS/Gal80TS* y *QF/QUAS* en el disco de ojo. **(A)** Se puede utilizar dos TA *Gal4* que dirijan la expresión en las células gliales y las células del disco de ojo al mismo tiempo o se puede emplear de manera simultánea los sistemas *QF/QUAS* y *Gal4/UAS/Gal80TS*, modulando el sistema *QF* de manera independiente al sistema *Gal4* que responde exclusivamente al represor *Gal80TS*. **(B)** Expresión de una proteína fluorescente nuclear (derecha) y un citoplasmática (izquierda). El sistema puede refinarse al dirigir simultáneamente la expresión de proteínas en dos tejidos diferentes con sistemas de represión independientes.

4. Protocolo de ablación genética.

Se utilizó el sistema *Gal4/UAS/Gal80TS* para promover la sobreexpresión de genes inductores de la apoptosis. La ventaja de utilizar un sistema dependiente de la temperatura es que se puede controlar tanto la región en la que se induce la ablación (gracias al *Gal4*) como el momento del desarrollo en el que se requiera la formación de la herida. Para estandarizar la edad de las larvas sometidas a la inducción de la ablación genética se realizaron puestas de embriones de 24 horas, mantenidas 8, 5 o 3 días a temperatura restrictiva de 17°C. Tras

este periodo se transfirieron las larvas a temperatura permisiva de 29°C para inactivar el *Gal80TS*. La ablación genética en estos experimentos se indujo durante la progresión entre el segundo y tercer estadio larvario. En otros experimentos las larvas se transfirieron a 29°C al cuarto día después de la puesta para asegurarse que la expresión ectópica se mantuviera durante un periodo de tiempo más prolongado. Tras un periodo de ablación variable, en los experimentos que se indique se devolvieron las larvas a 17°C para volver a activar el *Gal80TS* y permitir así un periodo de recuperación.

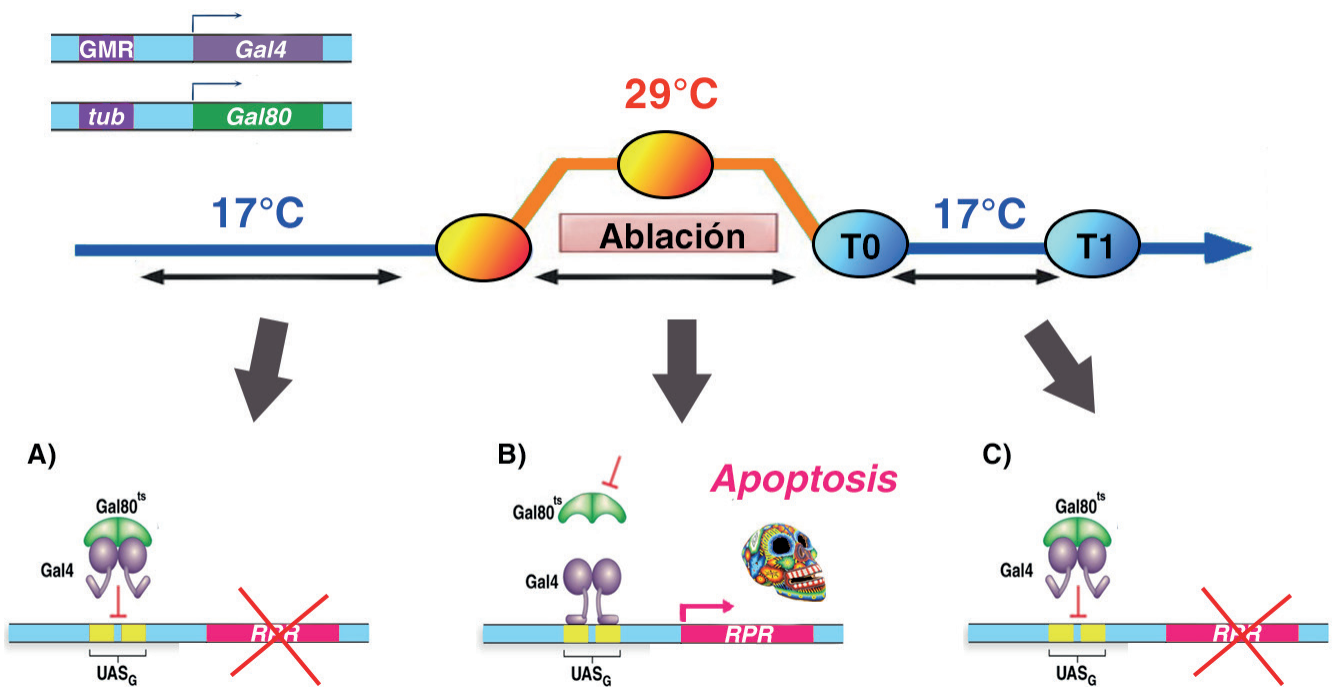


Figura M4. Método de ablación genética. (A) En larvas que se mantienen a 17°C el represor *Gal80TS* bloquea la actividad de la proteína Gal4, y por lo tanto la expresión de las secuencias UAS. (B) Cuando las larvas se llevan a 29°C el represor *Gal80TS* se inactiva, esto conlleva la expresión del gen pro-apoptótico *rpr*. (C) Una vez que las larvas se regresan a 17°C la actividad de *Gal80TS* se recupera, provocando que nuevamente se bloquee la expresión de *rpr*.

5. Tinciones inmunohistoquímicas.

Las larvas se diseccionaron en PBS durante 10 minutos. Posteriormente los tejidos se fijaron durante 40 minutos en una solución de paraformaldehído al 4% (diluido en PBS). Luego, se realizaron 3 lavados con PBT (PBS + TRitón x-100 al 0.03%), con un intervalo de 5 minutos entre cada lavado. Después se realizaron 3 lavados con PBT + BSA al 1%, con un intervalo de 10 minutos entre cada lavado. Estos tejidos se incubaron en una solución de PBT con anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. El siguiente paso consistió en retirar el anticuerpo primario para lavar los tejidos con PBT (3 veces durante 30 minutos). A continuación, los tejidos se incubaron en PBT con anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente se hicieron 3 lavados durante 30 minutos con PBT y se montaron en medio Vectashield (Vector Laboratories TM).

A continuación, se enlistan los anticuerpos primarios utilizados para la detección de distintas proteínas en

MATERIALES Y MÉTODOS.

el disco imaginal:

- Anti-Caspasa 1 (Cell signalling Technology; 1:200) desarrollado en conejo.
- Anti- β -Galactosidasa (Promega; 1:200) desarrollado en ratón.
- Anti- β -Galactosidasa (Cappel 1:1000) desarrollado en conejo.
- Anti-Elav (Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB); 1:50) desarrollado en rata.
- Anti-Histona 3 fosforilada (Cell signalling Technology; 1:600) desarrollado en conejo.
- Anti-Egr(1:400) desarrollado en conejo.
- Anti-Repo (DSHB; 1:50) desarrollado en ratón.
- Anti-Mad fosforilada (Martin y Morata, 2006; 1:1000) desarrollado en conejo.
- Anti-Wingless: (DSHB, 1:50), desarrollado en ratón.
- Anti-pMad (cedido por De celis, 1:200) desarrollado en conejo.
- Anti-Ptc (cedido por Isabel Guerrero, 1:1000) desarrollado en ratón.

Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos Alexa fluor 488, 555, 647 y fluoróforos Pacific blue procedentes de Thermo Fisher Scientific. También se empleó un marcador de filamentos de actina, Faloidina conjugada con TRITC de Sigma y Medio de montaje Vectashield (Vector Laboratories TM) con marcador de ácidos nucleicos DAPI.

6. Adquisición y procesamiento de imágenes.

6. 1. Microscopía óptica.

Se utilizó una cámara digital Olympus DP71 y un microscopio estereoscópico Leica MZ FLIII para tomar imágenes de organismos adultos.

6. 2. Microscopía confocal.

Para la adquisición de imágenes de discos imaginales se utilizaron los microscopios confocales Zeiss LSM510 y LSM710 proporcionados por el Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”.

6. 3. Procesamiento de imágenes.

Para el procesamiento de imágenes se utilizaron los software ImageJ 1.46, Zeiss LSM Image Browser 3.5, Metaview (Meta Imaging Corporation Plus) y Adobe Photoshop CS3.

7. Cálculo de índice glial y mitótico.

Se calculó el número de células gliales en base a la cantidad de núcleos de estas células observados en la

región de la retina, delimitada entre el SM y el inicio del Nervio óptico. Este número de glías se dividió entre el área de la región diferenciada del disco de ojo. Las células en mitosis fueron detectadas por la expresión del marcador de la fase M del ciclo celular PH3 y se cuantificaron utilizando el software ImageJ 1.46. El índice mitótico se calculó en base a la fórmula: Número de células en mitosis / área de la región diferenciada del disco de ojo. Para llevar a cabo este análisis se utilizaron todos los planos focales de cada archivo digital. Se utilizaron al menos 10 discos por genotipo estudiado.

8. Cálculo del desplazamiento glial.

Para cuantificar el desplazamiento ectópico de las células gliales en el disco de ojo se estableció como parámetro longitudinal la distancia a la que se encontraban las células gliales respecto a la última fila de omatidios (líneas punteadas en Figuras R6 D' y R10 A) generada tras el paso del surco morfogénico, región a la que se le denominó Límite Neurogénico Anterior (LNA). Las unidades de dicha distancia se establecieron en base al número de filas de omatidios que hay entre el LNA y la fila más anterior de células gliales. Los valores positivos representan a las glías que sobrepasaron el LNA, los valores negativos simbolizan a las glías que no lo sobrepasaron y los valores "0" significan a las de células gliales que llegaron justo al borde neurogénico.

9. Análisis estadístico.

Salvo que se especifique otro dato, se analizaron al menos 10 ojos o discos imaginales de ojo de individuos del mismo sexo para cada genotipo. Los datos se expresaron como la media +/- del error estándar medio (Desviación estándar / Raíz cuadrada de n, siendo n el número de datos). Los datos fueron comparados usando la prueba de U de Mann-Whitney o la prueba Anova y Tukey para comparaciones múltiples. Todos los datos fueron analizados utilizando el programa GraphPadPrism 8 y 7. Las imágenes fueron tratadas con el programa Adobe-photoshop CS6.

10. Análisis de expresión del reportero TRE-GFP en células gliales.

Con la finalidad de demostrar de forma más clara las diferencias de expresión del reportero *TRE-GFP* entre los discos analizados, se estableció un ratio entre el porcentaje de células gliales que expresan el reportero *TRE-GFP* dentro de un área delimitada por 650µm² aproximadamente. De esta forma se puede calcular el porcentaje de células gliales que expresan *TRE-GFP*.

11. Elaboración del reportero puc2b-LacZ.

Para generar los reporteros de *puc-LacZ* usados en esta tesis se seleccionaron inicialmente dos zonas específicas de la región reguladora del gen *puc*. Se eligieron en base a los altos picos de actividad (PUC1 y PUC2) presentados en experimentos ATC-sec. Estos fragmentos fueron ampliados y clonados en el vector attB-hs44-nuc-lacZ de 11516 pb (que contiene el gen de la β-Galactosidasa), digerido previamente por las mismas enzimas de restricción de los insertos (HindIII y BglII). Para la amplificación de los fragmentos previamente seleccionados se empleó la técnica de PCR a partir de DNA genómico de *Drosophila*, empleando la enzima KOD (Novagen),

MATERIALES Y MÉTODOS.

utilizando un gradiente de temperatura de entre 55 y 70°C, seleccionando aquella temperatura que proporciona mejor resultado.

Los primers fueron generados a partir de la secuencia que se deseaba amplificar, añadiendo dianas de enzimas de restricción para la posterior digestión del fragmento:

PUC1: Forward: CAGTAAGCTTGCCGTCACCTTTTATCTGCCAACG

Reverse: CAGTAGATCTCGGGCTAATTGGACTGGGGTTCAA

PUC2: Forward: CAGTAAGCTTGGGGTGGCAATGACTCACAATAGG

Reverse: CAGTAGATCTCTGCAAAGATACATGCGGATCGG

Las dos secuencias (PUC1 y PUC2) seleccionadas como posibles enhancer del gen *puc* fueron divididas en fragmentos solapantes más pequeños para intentar determinar con mayor exactitud cuál es la región encargada de activar este gen en respuesta a una situación de estrés. La región PUC1 de 2782 pb fue dividida en tres fragmentos: PUC1A (978 pb), PUC1B (938 pb) y PUC1C (839 pb); mientras que la región PUC2 de 1636 pb fue dividida tan solo en dos fragmentos: PUC2A (897 pb) y PUC2B (578 pb). A todas estas regiones se les añadieron dianas para las enzimas de restricción BglII y HindIII, y se siguió el mismo protocolo detallado en anteriormente. Encontramos que de todos los reporteros generados por el fragmento contenido en la construcción *puc2B* se expresaba específicamente en las células gliales del disco de ojo y en el cerebro.

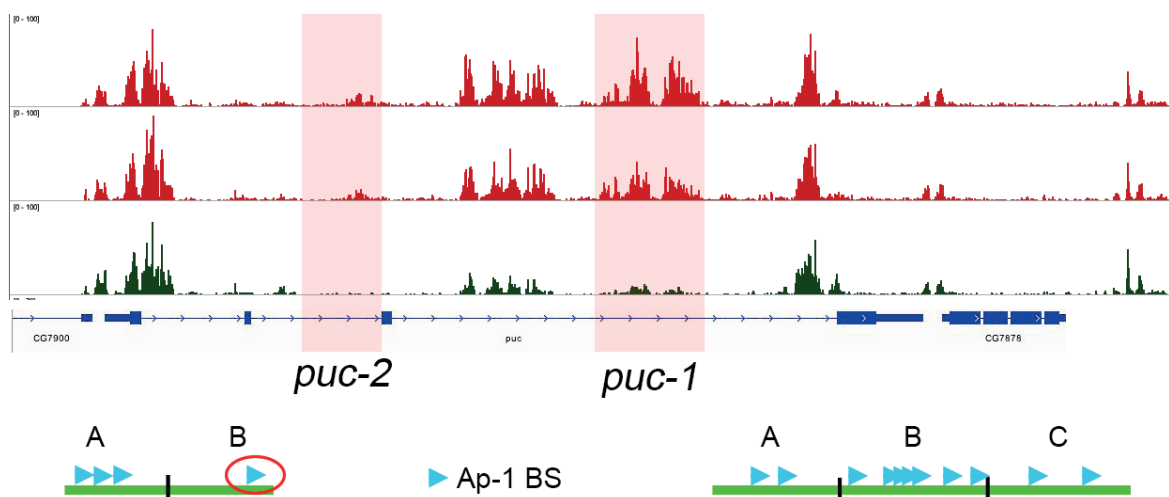


Figura M5. Generación de reporteros *puc*-LacZ. Para examinar mejor la actividad de la JNK en las células gliales se generaron varios reporteros LacZ utilizando diferentes fragmentos de la región reguladora del gen *puc*. Se utilizó el reportero con el fragmento 2B debido a que presentaba una señal fuerte principalmente en las células gliales.

RESULTADOS

RESULTADOS.

1. Respuesta del disco de ojo ante el daño producido por la ablación genética.

1.1. Efecto de diferentes tratamientos pro-apoptóticos en el disco imaginal de ojo.

Con la finalidad de seleccionar al gen pro-apoptótico más adecuado para inducir ablación genética en el disco de ojo, en primer lugar, se analizaron los efectos producidos por la sobreexpresión temporal de diferentes genes inductores de la apoptosis en el disco imaginal de ojo. Valiéndonos del sistema *UAS/Gal4/Gal80* empleamos inicialmente la línea *GMR-Gal4* debido a que restringe la expresión de los genes analizados a la región neurogénica del disco. Esta línea promueve la expresión del *Gal4* exclusivamente en toda la región posterior del SM (Figura 1M A). En nuestro ensayo se han sobreexpresado las construcciones *UAS* de los genes proapoptóticos *head involution defective* (*hid*) y *reaper* (*rpr*), y una forma constitutivamente activa del gen *hemipterous* (*hep^{CA}*), que es una quinasa que forma parte de la maquinaria de señalización de la vía de la JNK (Figura R1). Para ello se transfirieron larvas de segundo estadio larvario con genotipo *GMR-Gal4 tub-Gal80TS, UAS-X* (donde la X hace referencia a los diferentes genes analizados) a 29°C durante 72 horas. Tras este tiempo los discos fueron diseccionados y analizados.

Si bien se ha demostrado que estos tres genes tienen una gran capacidad para promover la apoptosis en diferentes tejidos de la mosca (Fan and Bergmann, 2014; Sandu *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2002; White *et al.*, 1996) los efectos que cada uno de ellos produce en el disco de ojo difieren notablemente entre sí. Para evaluar la inducción de apoptosis, se cuantificaron los niveles de la forma activada de la Caspasa-1 (Dcp-1). Cuando se analizó la sobre-expresión de *UAS-hid* (Figura R1 B) en el disco de ojo se encontró que la cantidad de Dcp-1 observada era similar a la de un disco control (Figura R1 A). Además, los discos no presentaron ningún tipo de alteración en la estructura del epitelio. Por el contrario, la sobreexpresión de *UAS-rpr* (Figura R1 C) dio lugar a una gran acumulación de Dcp-1 en la zona neurogénica del disco de ojo que provocó grandes alteraciones en la estructura del disco. Al evaluar los efectos causados por *UAS-hep^{CA}* (Figura R1 D), se observó que tras su sobreexpresión aparecían muchos plegamientos epiteliales y se producía acumulación de Dcp-1, aunque en menor cantidad que en el caso de *rpr*, pese a que está reportado que su sobreexpresión en la región posterior del ojo adulto provoca reducción del tamaño del ojo y defectos en la organización omatidial (Ma *et al.*, 2012; Geuking *et al.*, 2009). Estos resultados indican que el gen inductor de apoptosis más eficiente en el disco de ojo es *rpr*. Por lo tanto, para la presente tesis se decidió utilizar *UAS-rpr* como inductor de apoptosis.

RESULTADOS.

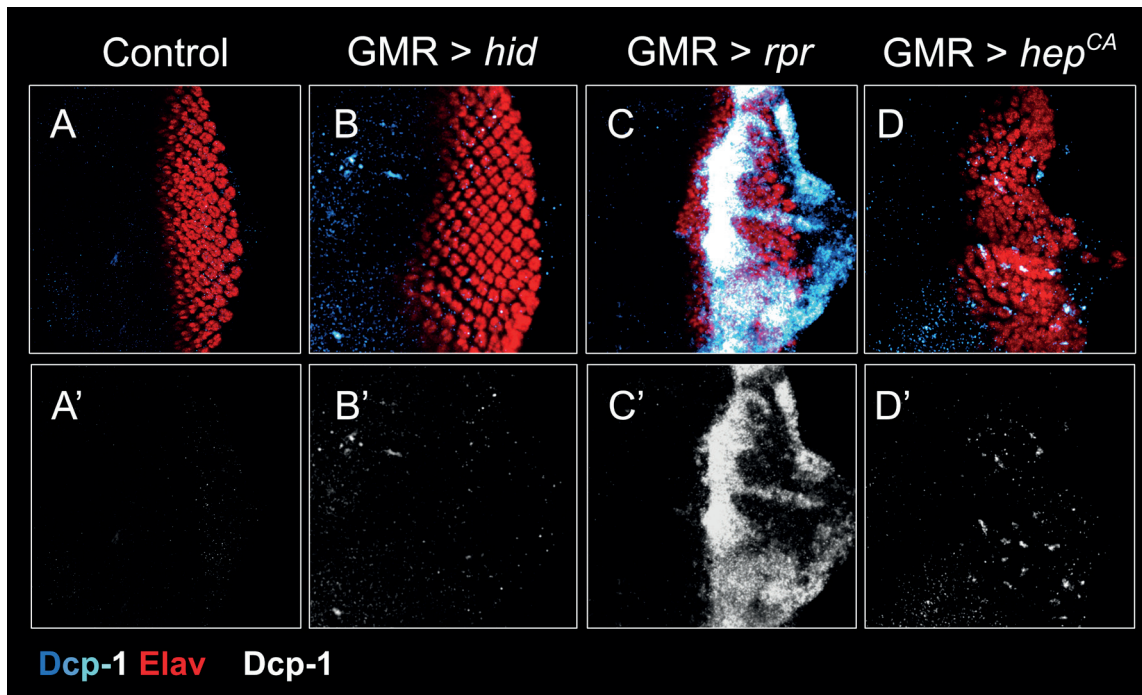


Figura R1. Comparación de diferentes tratamientos apoptóticos en la región neurogénica del disco de ojo. (A-D)

La expresión de Elav en rojo marca las neuronas fotorreceptoras y delinea la forma posterior del disco. Larvas de segundo estadio larvario fueron crecidas a 29°C durante 72 horas para inducir la expresión de las construcciones *UAS-hid* (B), *UAS-rpr* (C) y *UAS-hep^{CA}* (D), junto al respectivo control (A). La expresión de Dcp-1 se utiliza como indicador de la muerte celular programada y se muestra en un gradiente de azul a blanco (la degradación al blanco indica mayor concentración) en (A-D) y en gris en (A'-D'). **(A, A')** La expresión de Dcp-1 en un disco control se restringe a regiones muy concretas tanto en la zona no diferenciada (anterior) como en la región posterior, y en bajas concentraciones. **(B, B')** Los discos con expresión ectópica de *hid* en la zona posterior no presentaron un incremento en la concentración de Dcp-1 respecto al control. **(C, C')** Después de la inducción de *rpr* en la región posterior del disco, se detectó una alta concentración de Dcp-1. **(D, D')** Aunque los niveles de Dcp-1 se incrementaron al activar la ruta de la JNK por medio de *hep^{CA}*, no se alcanzaron los niveles observados cuando *UAS-rpr* fue sobreexpresado. La activación de la vía de la JNK provocó cambios en la estructura epitelial del disco, al formarse pliegues ectópicos. Los discos están orientados con la región posterior hacia la derecha.

El siguiente paso fue establecer cuál era la línea *Gal4* más adecuada para nuestro estudio, por lo que se compararon los efectos producidos al sobreexpresar *UAS-rpr* con las líneas *hh-Gal4 sev-Gal4 dlp-Gal4* y *GMR-Gal4* cuyos dominios de expresión se restringen a la región neurogénica del disco de ojo y derivan de regiones reguladores de los genes *hedgehog*, *sevenless*, *dally-like* y *glass* respectivamente. Para llevar a cabo este experimento, larvas de segundo estadio larvario (Figura R2) con genotipo *X-Gal4 tub-Gal80^{TS}, UAS-rpr* (donde la X hace referencia a los diferentes promotores génicos analizados) fueron transferidas a 29°C durante 72 horas. Tras este tiempo los discos fueron diseccionados y analizados. La inducción de *UAS-rpr* con *hh-Gal4* no produjo ningún incremento en la expresión de Dcp-1 en la región posterior al SM, de manera que no se produjo ningún tipo de ablación genética. Curiosamente, a pesar de no observar un incremento de apoptosis, los discos de ojo de larvas con este genotipo eran de menor tamaño que los controles (Figura R2 B). El dominio de expresión de *sevenless* (*sev*) se restringe a algunos fotorreceptores y a las células cono en la región diferenciada del disco. Al sobreexpresar *UAS-rpr* con *sev-Gal4* se produjo una extrusión de omatidios por la región basal (cabezas de flecha en Figura

R2 C') y un incremento considerable de Dcp-1 alrededor de algunos grupos omatidiales. Pese a que la apoptosis fue mayor que la provocada por la línea *hh-Gal4* no fue suficiente para provocar la formación de una herida en el disco. Debido a los efectos producidos por esta línea, podría considerarse muy útil para estudiar las consecuencias de inducir muerte celular en regiones muy puntuales dentro del tejido ocular (Figura R2 C y C'). En cuanto a la expresión de *UAS-rpr* con la línea *dlp-Gal4* no se observó ningún incremento en la concentración de Dcp-1, ni tampoco se indujeron cambios en la estructura epitelial del disco (Figura R2 D). Aunque el dominio de expresión de *dlp-Gal4* se ciñe a la región posterior ventral del disco, estos discos presentaron una acumulación de Dcp-1 en el área anterior del ojo y en la región de la antena (cabezas de flecha en Figura R2 D). Además, se encontró que en estos discos el patrón de distribución de los fotorreceptores está muy alterado comparado con el patrón regular que se observa en discos controles. Por último, se utilizó la línea *GMR-Gal4* que como ya se comentó anteriormente, cuando se utiliza para sobreexpresar *UAS-rpr* da lugar a discos que presentan una gran concentración de Dcp-1 únicamente en la región posterior del SM y promueve de manera consistente un daño significativo en esta región (cabezas de flecha en Figuras R2 E y E'). En estos discos la región anterior al SM y el área de la antena del disco no presentó alteraciones ni acumulación de caspasa. Por lo tanto, considerando todos estos resultados, se decidió emplear en este estudio la línea *GMR-Gal4* para examinar los efectos causados por la inducción de ablaciones genéticas en la región neurogénica (posterior al SM) del disco de ojo.

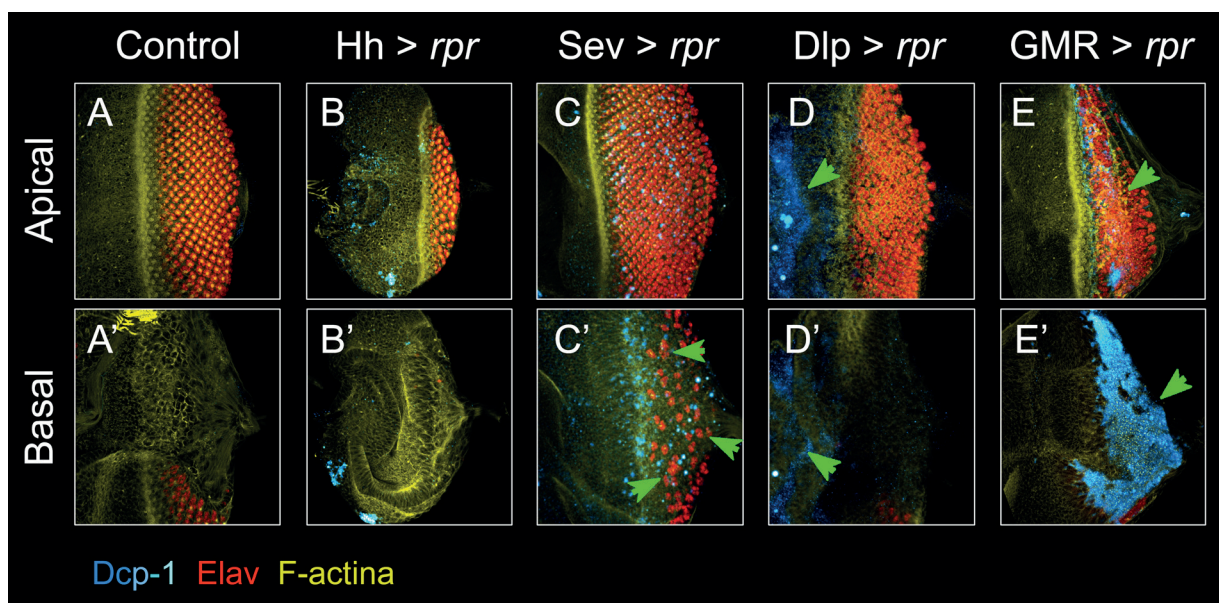


Figura R2. Ablación en la región posterior del disco de ojo con diferentes líneas *Gal4*. (A-E') Discos de tercer estadio larvario teñidos con el marcador neuronal Elav en rojo, el marcador de muerte celular Dcp-1 en un gradiente de azul a blanco (la degradación hacia el blanco indica mayor concentración) y Faloidina que evidencia los cúmulos de F-actina de las células en amarillo. (A, A') No se detectaron cúmulos de Dcp-1 en la región posterior de los discos control con el genotipo *GMR-Gal4/UAS-GFP*. (B, B') Del mismo modo no se detectó caspasa-1 en la región posterior de los discos con genotipo *UAS-rpr/+; hh-Gal4/+*. (C, C') La inducción de apoptosis en discos con el genotipo *UAS-rpr/+; sev-Gal4/+* provocó el desprendimiento de omatidios hacia la región basal del disco y la acumulación de caspasa tanto en la zona apical como la basal (cabezas de flecha verdes). (D, D') En los discos con el genotipo *UAS-rpr/+; dlp-Gal4/+* no se detectó Dcp-1 en la región posterior, sin embargo,

RESULTADOS.

la estructura de los grupos omatidiales fue irregular y la acumulación de caspasa fue detectada cerca de la región del disco de antena. (E, E') La estructura epitelial de la región posterior de discos *UAS-rpr* / +; *GMR-Gal4* / + fue alterada al expresar el inductor *UAS-rpr*, formándose una herida en la región epitelial y acumulación de caspasa-1 en la parte basal. Los discos están orientados con la región posterior hacia la derecha.

1.2. Efectos del tratamiento de ablación durante diferentes momentos del desarrollo del ojo.

Con la finalidad de examinar si a lo largo del desarrollo del disco de ojo existen cambios en cuanto a la respuesta regenerativa, se analizaron los efectos producidos en los discos de ojo de larvas *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* que fueron sometidas a un proceso de ablación genética a distintos tiempos durante el desarrollo. Como controles se utilizaron larvas *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* que se sometieron al mismo protocolo de cambios de temperatura. Para realizar este experimento, se permitió que las larvas se desarrollaran durante 8, 9 ó 10 días a 17°C (temperatura restrictiva). A los tiempos indicados anteriormente, las larvas se trasladaron a una cámara de 29°C (temperatura permisiva) durante 24 horas, con la finalidad de inducir la expresión de *UAS-rpr* y provocar la ablación genética a distintos momentos del desarrollo. Tras el periodo de inducción algunas larvas fueron diseccionadas, momento que se definió como T0, mientras que otras fueron trasladadas a 17°C para permitir la recuperación del disco y analizar los efectos a distintos tiempos tras la ablación o el fenotipo adulto. En discos controles la expresión de Dcp-1 se restringe a algunas células aisladas (Figura R3 A). En cuanto a los discos de larvas sometidas a la ablación tras 8 días de desarrollo, se encontró que tenían una alta acumulación de Dcp-1 en una banda paralela al SM (Figura R3 B), a pesar de esto, los discos lograron desarrollarse hasta formar un ojo adulto muy similar al de un control (Figura R3 B'), aunque un 7% más pequeño que los controles (Figura R3 E). Por otro lado, las larvas tratadas a los 9 días del desarrollo presentaban discos con mucha mayor expresión de Dcp-1 (Figura R3 C). En los ojos adultos de estas larvas frecuentemente aparecía una cicatriz (Figura R3 C') y su tamaño era un 33% más pequeño que el de los ojos control (Figura R3 E). Más notoria fue la incapacidad del tejido para recuperarse cuando la inducción de la herida se hizo a los 10 días del desarrollo (Figura R3 E). Los organismos bajo este tratamiento siguieron su desarrollo hasta la metamorfosis, pero durante el desarrollo de la pupa, el tejido ocular se necrosó (Figura R3 D'). Esto podría deberse a que el tratamiento tardío limita el tiempo de recuperación del disco antes de la pupación, periodo umbral donde la mayoría de las células dejan de responder a señales proliferativas. Estos resultados muestran que los discos de ojo tienen capacidad de recuperarse cuando son dañados, pero esta capacidad va desapareciendo durante el desarrollo.

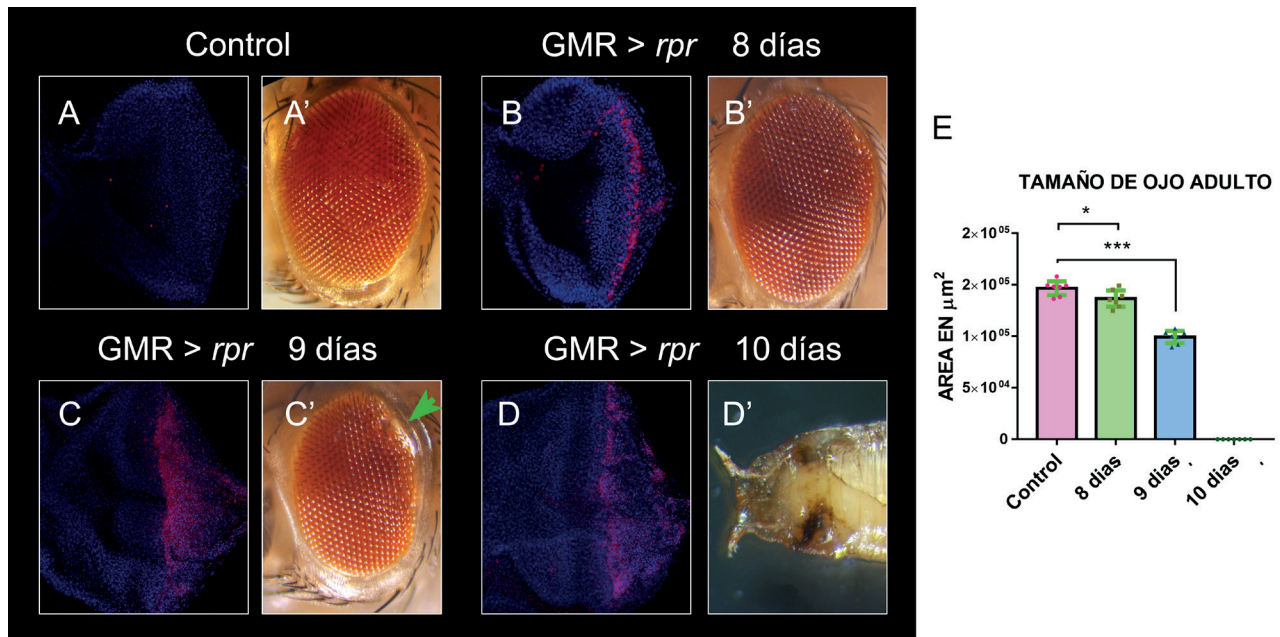


Figura R3. Efectos de la ablación genética durante diferentes momentos del desarrollo del disco de ojo. (A, B, C y D) Se muestra la región basal de discos de ojo de tercer estadio larvario, con el genotipo: *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* sometidos a diferentes tratamientos de inducción apoptótica, a los 8 (B), 9 (C) y 10 días (D) después de la puesta, junto al disco control con el genotipo *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* (A) que fueron teñidos con el marcador nuclear DAPI en azul y con el marcador de muerte celular Dcp-1 en rojo. (B-B') Los discos de 8 días de edad sometidos al tratamiento presentaron una acumulación de Dcp-1 en la región posterior del SM (B) y se recuperaron hasta formar un ojo adulto (B') similar al de un ojo adulto control (A'). (C-C') En los discos con tratamiento a los 9 días de desarrollo, Dcp-1 se acumuló en mayor cantidad que los discos de 8 días de desarrollo (C) y no se pudieron desarrollar como un ojo adulto normal, dejando una cicatriz en el ojo adulto (cabeza de flecha en C'). (D-D') Los discos de larvas tratadas a los 10 días de desarrollo no lograron recuperarse por lo que la región ocular de los faratos se necrosó (D'). Los discos y ojos adultos están orientados con la región posterior hacia la derecha. Y vista dorsal de un farato que se encuentra dentro del pupario, orientado con la parte posterior hacia la derecha. (E) El gráfico muestra la estimación del tamaño de ojos adultos en μm^2 . Las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples fueron utilizadas para comprobar que los ojos adultos con tratamiento a los 8 y 9 días de desarrollo son menores que los ojos control. control > 8 días y control > 9 días con un nivel de significancia de $*=P<0.01$ y $***=P<0.0001$ respectivamente ($n=7$). Las barras de error representan IC 95%.

1.3. Reconstrucción del ojo después de la ablación genética.

Los resultados anteriores indican que los discos de ojo son capaces de recuperarse y dar lugar a un ojo adulto relativamente normal tras 24 horas de ablación a los 8 días de desarrollo. Por lo que se analizó la dinámica temporal de la recuperación de discos tras 0 (T0), 24 (T1) y 48 (T2) horas desde la inducción apoptótica. Se observó que inmediatamente después de la ablación genética (T0) las células apoptóticas se extruían por la región basal del disco, denotado por la alta concentración de Dcp-1 en esa región (cabezas de flecha blanca en Figura R4 B' y B''). Estos discos presentan un fuerte incremento de la cantidad de F-actina en la región apical de la herida (cabezas de flecha rosa en Figura R4 B). 24 horas después de la ablación (T1), el SM continuó su avance dejando tras de sí nuevas filas de omatidios (cabeza de flecha rosa en Figura R4 C) con un patrón normal, sin embargo, las células fo-

RESULTADOS.

torreceptoras en la región dañada se acumularon en la región basal y mostraron una distribución muy aberrante (cabeza de flecha rosa en Figura R4 C''). Estos fotorreceptores aberrantes no expresaron Dcp-1, la expresión de este marcador apoptótico se restringió a cúmulos localizados en la región basal de la zona más posterior del disco, en células que no expresan el marcador neuronal Elav (cabezas de flecha blanca en Figuras R4 C' y C''). Tras 48 horas de recuperación (T2), se encontró que la herida se había cerrado (cabezas de flecha rosa en Figura R4 D). Además, las células apoptóticas de la zona basal se habían eliminado mientras que la formación de nuevas filas de fotorreceptores continuaba (Figuras R4 D, D' y D''). En todos los casos analizados se observó que la mayoría de las células muertas no eran fotorreceptoras, ya que sólo aparecen unos pocos fotorreceptores que expresan Dcp-1. Esto podría explicarse debido a que estas células expresan altos niveles de Diap-1, por lo que su sensibilidad a morir es menor (Fan y Bergmann, 2008).

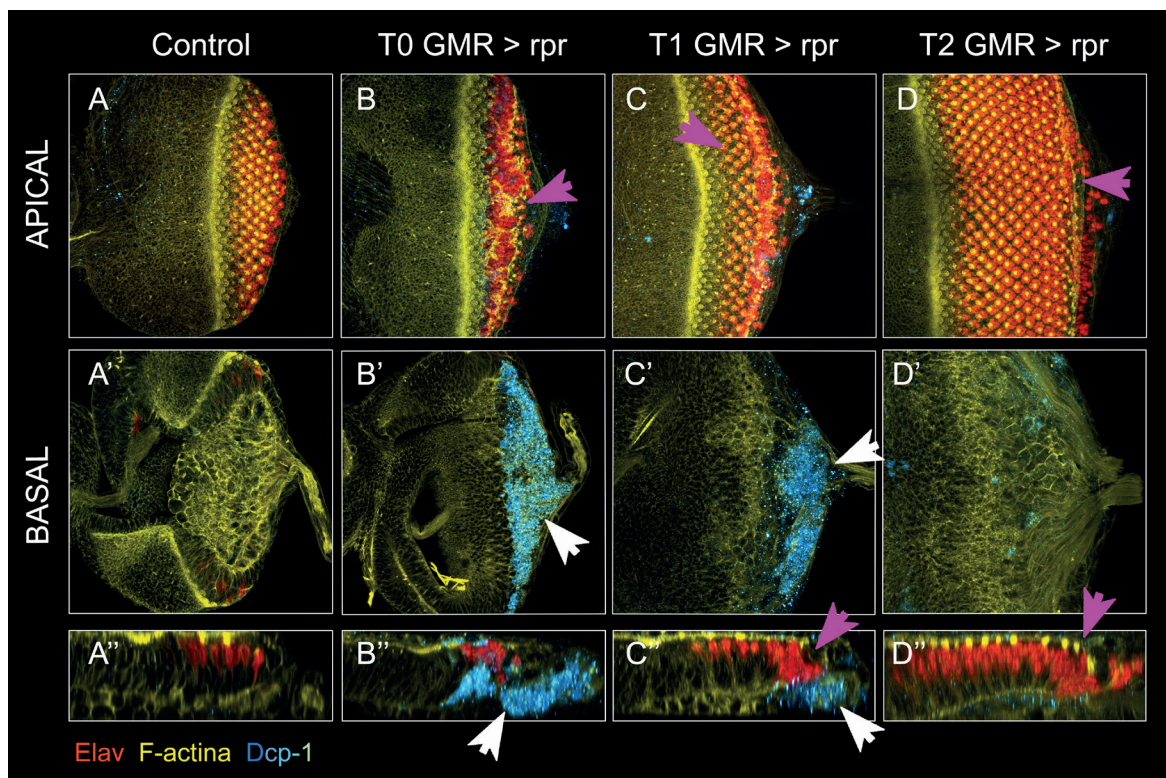


Figura R4. Respuesta del disco de ojo después de la inducción apoptótica. Se muestran discos de ojo *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* control (A, A', A''), discos *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* diseccionados inmediatamente después de la ablación genética "T0" (B, B', B''), discos diseccionados 24 horas después de la ablación "T1" (C, C', C'') y discos que se recuperaron durante 48 horas después de la apoptosis (D, D', D''). Los discos fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en rojo, el marcador de muerte celular Dcp-1 en gradiente de azul a blanco (la degradación hacia el blanco indica mayor concentración) y con Faloidina que evidencia los cúmulos de F-actina de las células en amarillo. Se muestra un plano apical de los discos en la parte superior de la figura, un plano basal en la zona central. En el recuadro inferior de cada tiempo se muestra un corte tangencial. (A, A', A'') Las células fotorreceptoras situadas en la región apical (A y A') no expresaron Dcp-1 durante el desarrollo normal del disco. (B, B', B'') Las células apoptóticas se extruyen por la región basal del disco donde se concentra Dcp-1 (cabezas de flecha blanca). También se observaron cúmulos de actina en la región apical del disco (cabezas de flechas rosas). (C, C', C'') Después de 24 horas de inducir el daño se observó un plegamiento de células en torno a la herida (cabezas de flechas rosas) y el desplazamiento de células apoptóticas hacia la parte posterior del disco (Flechas blan-

cas). (D, D', D'') La herida se cerró 48 horas después de sobreexpresar *UAS-rpr* (cabezas de flechas rosas) y se eliminaron las células apoptóticas. Los discos están orientados con la región posterior hacia la derecha

1.4. La ablación de la región neurogénica del disco de ojo produce una respuesta proliferativa.

Nuestros resultados indican que, tras la inducción de un daño en el área neurogénica del disco de ojo, éste tiene la capacidad de recuperarse y dar lugar a un ojo adulto de un tamaño similar al de los controles (Figura R3 B'). Esto sugiere que los mecanismos de compensación proliferativa podrían estar ayudando a que el tejido reemplace el número de células que se pierden después de la ablación. Estudios anteriores han demostrado que existe este tipo de proliferación compensatoria cuando los discos de ojo han sido dañados (Fan y Bergmann, 2008). Por lo que se analizó el patrón proliferativo en discos de ojo después de la inducción de la herida usando nuestro abordaje experimental. Para ello, se analizó la expresión del marcador de la fase M del ciclo celular fosfo-Histona3 (PH3) en discos con el genotipo *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* y el genotipo control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* a tiempos T0 y T1 tras la ablación. Se determinó el índice mitótico (ver protocolo en M8) de 3 regiones diferentes del disco: La región anterior del disco que corresponde a la zona más alejada de la herida y que se encuentra en constante proliferación (flechas verdes en Figuras R5 A, B y C). La región de la segunda Oleada Mitótica (SOM) donde se observa un patrón de división muy definido que se forma de manera paralela al SM (flechas blancas en Figuras R5 A, B y C). Y la región posterior del disco donde la mayoría de las células no se dividen (flechas rojas en Figuras R5 A, B y C).

Inmediatamente después de la ablación (T0), se encontró que la región anterior del disco de ojo no presentó cambios respecto al índice mitótico observado en los discos controles (flecha verde en Figura R5 B y Figura R5 D). Sin embargo, tras 24 horas de recuperación (T1) se observó que el índice mitótico aumentaba significativamente en esta región (flecha verde en Figura R5 C y Figura R5 E). Este resultado sugiere que existe una señal emitida a partir de la región apoptótica que promueve un incremento en la división de células situadas en una región alejada de la herida. Por otro lado, se encontró que a T0 el índice mitótico disminuyó en la región de la SOM (flecha blanca en Figura R5 B y Figura R5 D). Pero una vez que transcurrió el tiempo de recuperación (T1), la zona de la SOM presentó una tasa proliferativa normal (flecha blanca en Figura R5 C y Figura R5 E). Durante el desarrollo normal del disco, la región posterior presenta una escasa proliferación (Flecha roja en Figura R5 A), sin embargo, la señal producida por la ablación provocó que algunas de las células de esta zona se dividieran tanto en T0 como en T1 (cabezas de flecha rosas en Figura R5 B y C y Figuras R5 D y E). Estos datos confirman los resultados previamente publicados por otros grupos (Meserve y Duronio, 2017; Fan y Bergmann, 2008) donde indican que la lesión en la región posterior al SM promueve Proliferación Compensatoria. Además, nuestros resultados sugieren que deben existir señales que bloquean temporalmente la segunda división mitótica.

RESULTADOS.

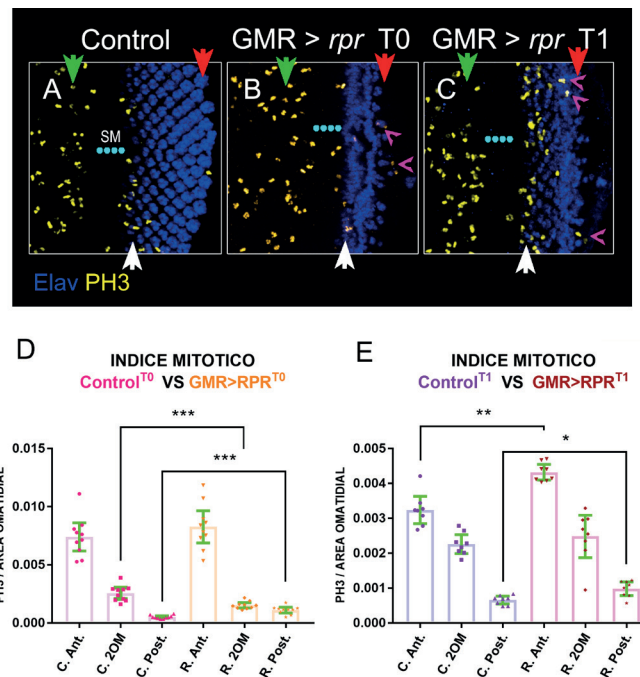


Figura R5. Respuesta proliferativa del disco de ojo después de la ablación genética. (A-C) Se muestran un disco de ojo control con el genotipo *GMR-Gal4 tub-Gal80TS/UAS-GFP* (A), un disco analizado inmediatamente después de la ablación genética (T0) (B) y un disco diseccionado 24 horas después de la ablación (T1), ambos con el genotipo *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80TS/+* (C). Todos fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul y el marcador mitótico Ph3 en amarillo. (A-D) La región anterior del disco control (Flechas verdes) presenta un alto índice de proliferación (A) que no se ve alterado en discos a T0 (B), sin embargo, es mayor en el tiempo T1 (C). En la zona de la SOM (Flechas blancas) la tasa proliferativa disminuye cuando se induce la herida (B). Después de 24 horas se estabiliza manteniendo un nivel de proliferación similar al control (C). En la región posterior al SM (Flechas rojas) la proliferación aumenta tanto a T0 como a T1 (cabezas de flecha rosas). Los discos están orientados con la región posterior hacia la derecha. (D, E) Medición del índice mitótico de las regiones anterior (C. Ant.), Segunda Ola Mitótica (SOM) y posterior (Post.) de discos T0 (D) y discos T1 (E) comparados con sus respectivos controles. (D) La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para comparar cada una de las regiones dañadas con su respectivo control, encontrándose que disminuye la tasa proliferativa en la zona de la segunda oleada mitótica (SOM) de los discos “T0” ($C. 2OM > R. 2OM$) y que aumenta en la región posterior de los discos “T0” ($C. Post. < R. Post.$) con un nivel de significancia de $***=P=0.0002$ y $n=10$. (E) El gráfico muestra el índice mitótico de discos control y discos con herida en tiempo “T1”. Se utilizó el test de Mann-Whitney para comparar cada una de las regiones dañadas con su respectivo control, demostrándose que el índice mitótico aumenta en la región anterior y posterior de discos “T1” ($C. Ant. < R. Ant.$ y $C. Post. < R. Post.$ con un nivel de significancia de $*=P=0.0148$ y $**=P=0.0019$ respectivamente ($n=8$). Las barras de error representan IC 95%.

1.5. Durante la reparación de la herida se incrementa el número de células gliales en el disco imaginal de ojo.

Una de las respuestas regenerativas que ocurre en el sistema nervioso como consecuencia de un daño es el incremento de la actividad glial en la zona afectada. Por lo que se decidió analizar cuál es el comportamiento de las células gliales en los discos de ojo cuando éstos son dañados. Con este fin, se analizó el número de células gliales de discos de ojo control y discos dañados a tiempo T0 y T1. Para

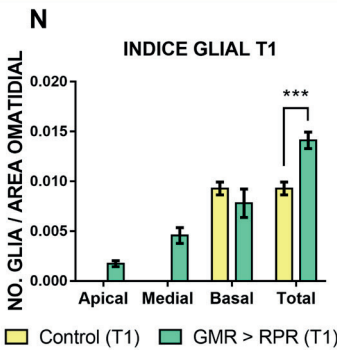
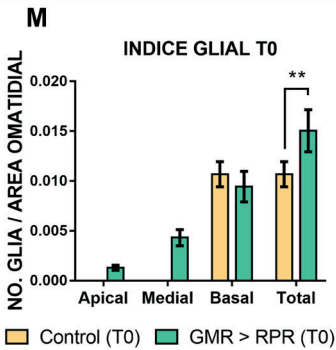
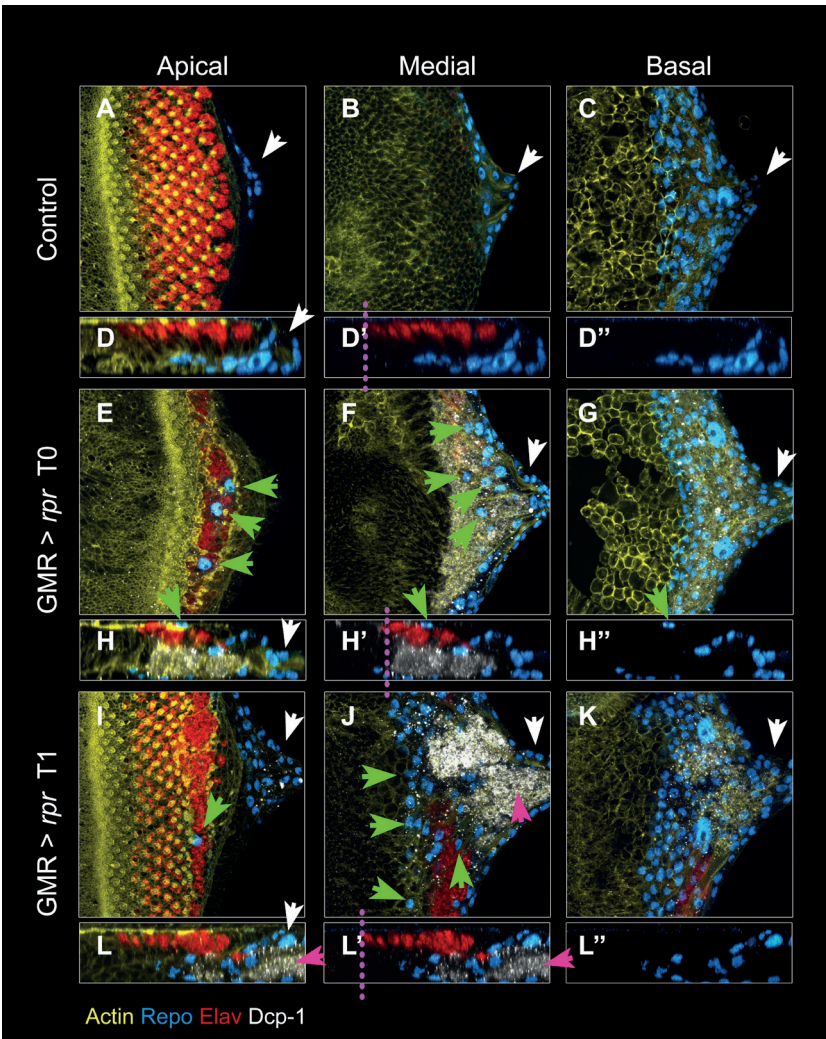
ello se utilizaron larvas de tercer estadio larvario *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* y larvas control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP*. Durante el desarrollo larvario, las células gliales migran a través del nervio óptico (flechas blancas en Figura R6 C) para ocupar la región basal del disco de ojo (Figura R6 C). Esta migración glial se efectúa hacia la región anterior donde se están formando nuevas neuronas tras el paso del surco morfogenético. Durante este periodo se puede ubicar en el disco de ojo el Límite Neurogénico Anterior (LNA), frontera que las células gliales nunca sobrepasan. Este límite se sitúa entre 0-4 filas de omatidios detrás del Surco Morfogenético (línea punteada rosa en Figura R6 D'). Sin embargo, cuando se indujo la ablación genética se observó que las células gliales avanzaron más allá de los límites normales, superando la frontera delimitada por el Surco Morfogenético (línea punteada rosa en Figura R6 H'). Además, a diferencia de lo que ocurre en los discos controles, en los que las células gliales siempre se localizan en la región basal del disco, en discos dañados se observaron células gliales en la región apical del disco (flechas verdes en Figuras R6 E-H''). La invasión de zonas apicales y más allá del umbral neurogénico podría ser una reacción similar a la que ocurre con los astrocitos en vertebrados, que consiste en envolver y aislar la región de la herida del resto del tejido nervioso (Rao y Rolls, 2017; Silver and Miller, 2004), y que podría estar mediada por señales específicas que controlan la atracción y proliferación neuronal (Lemek, 2001).

Asimismo, se observó que a T0 el número total de células gliales se incrementó respecto al control (Figura R6 M). Este incremento se debe principalmente al aumento de células gliales en las zonas mediales y apicales de los discos. Una vez transcurridas 24 horas de recuperación (T1), el número de células gliales siguió siendo mayor que en discos control (Figura R6 N), se localizaron glías en planos apicales y mediales (flechas verdes en Figuras R6 I y J) y el "límite neurogénico" anterior de las células gliales se volvió a restablecer (línea punteada rosa en Figura R6 L'). Se conoce que en el tejido neuronal de vertebrados la eliminación de material apoptótico se lleva a cabo por células gliales como los astrocitos o la microglía. De manera, que una posible explicación para el incremento de las células gliales y el comportamiento migratorio observado en discos dañados es que podrían estar relacionados con funciones fagocíticas de la glía durante la recuperación del disco.

Figura R6. Incremento del número de células gliales durante la formación de la herida.(A-L'') Se muestra un plano apical (A, E y I), medial (B, F y J) y basal (C, G y K) de un disco de ojo control de genotipo *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* (A-C), un disco *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* diseccionado inmediatamente después de la ablación (E-G) y un disco diseccionado 24 horas después de la ablación (I-K). Los discos fueron teñidos con el marcador glial Repo en azul, el marcador neuronal Elav en rojo, el marcador de muerte celular Dcp-1 en gris y con Faloidina que evidencia los cúmulos de F-actina en amarillo. D, D', D'', H, H', H'', L, L' Y L'' son cortes transversales de los discos. La línea punteada marca el límite anterior que alcanzan las células gliales. **(A-D'')** En un disco control las células gliales migran a través del nervio óptico (flechas blancas) y ocupan la región basal del disco (C). **(D-D'')** La glía continúa desplazándose hacia la zona anterior del disco, donde se originan nuevas neuronas fotorreceptoras que proyectan sus axones hacia las células gliales, deteniendo su migración (línea punteada rosa en D'). **(E-H'')** Como consecuencia de la ablación genética, las células gliales se desplazaron a regiones más apicales (flechas verdes) y anteriores (línea punteada rosa en H'), sobrepasando el límite al que llegan las células gliales en un disco control. Además, su número en la región del ojo aumentó respecto a un control. **(I-L'')** 24 horas después, todavía se

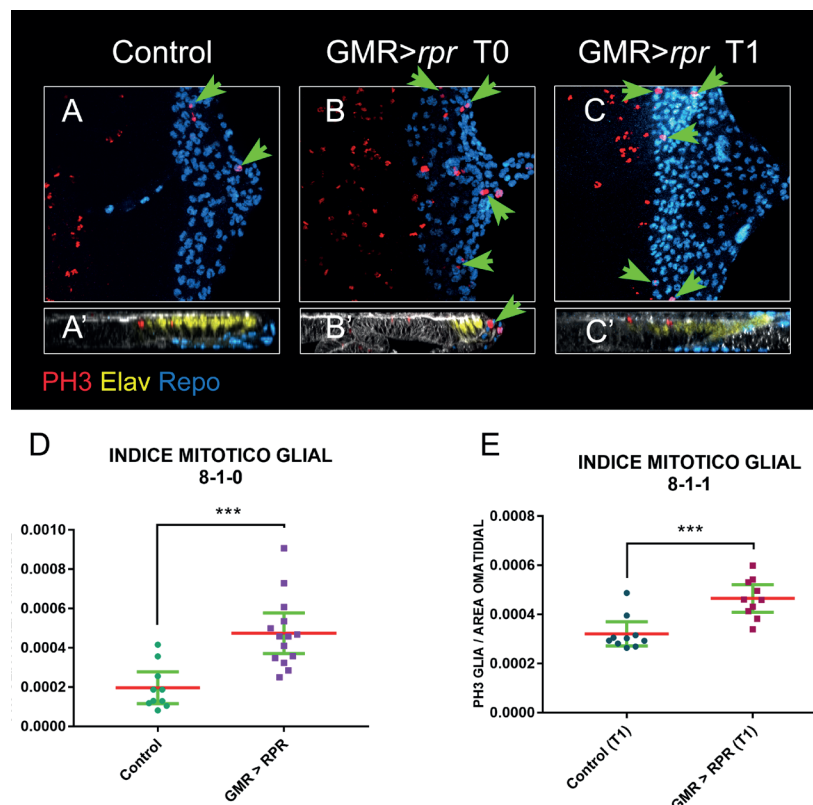
RESULTADOS.

observaron células gliales en planos mediales y apicales (flechas verdes), así como un mayor número de células respecto al control. El límite migratorio de las células gliales volvió a ser similar al de discos control (línea punteada rosa en L'). El material apoptótico se removió hacia la región del nervio óptico (flechas rosas). **(M, N)** Medición del número de células gliales en discos "T0" y "T1" comparados con su respectivo control. Los discos control no presentan células gliales en regiones apicales o mediales. **(M)** El gráfico muestra el índice glial (No. de glía / área omatidial) de discos control y discos con herida "T0". La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para comprobar que el número total de células gliales aumenta después de inducir la herida (Control total < GMR>RPR total) con un nivel de significancia de $**=P=0.0042$ (n=9 y n=11 respectivamente). **(N)** El gráfico muestra el índice glial de discos control y discos con herida "T1". Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para comprobar que el número total de células gliales es mayor tras la recuperación (Control total < GMR>RPR total) con un nivel de significancia de $***=P=0.0002$ (n=9 y n=7 respectivamente). Las barras de error representan IC 95%.



1.6. Respuesta proliferativa de las células gliales ante la inducción de un daño en el disco de ojo.

Debido a que la ablación de la zona neurogénica del disco es capaz de desencadenar señales que alteran la tasa proliferativa en regiones aledañas, e incluso en otros dominios, se decidió analizar si la inducción de apoptosis en el disco de ojo era capaz de alterar el índice mitótico de las células gliales, lo que explicaría el incremento de estas células en el disco de ojo. Como hemos comentado anteriormente las células gliales contenidas en los discos de ojo tienen un origen embrionario distinto al del resto de células de este disco, como consecuencia de esto, estas glías tienen que migrar desde regiones muy alejadas del disco y atravesar el nervio óptico para ocupar la región basal de los discos. Durante este trayecto, existen algunas células gliales que mantienen su capacidad de dividirse, e incluso algunas pueden proliferar al llegar a la región del disco (Figura R7 A y A'). Para determinar si el aumento de glías observadas en discos dañados se debía un incremento de la proliferación glial, se analizó el índice mitótico de las células gliales en los discos controles *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* y discos dañados *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* inmediatamente después de inducir la apoptosis durante 24 horas (Figuras R7 B y B') y tras 24 horas de recuperación (Figuras R7 C y C'). Para ello, se utilizó el marcador nuclear de células gliales Repo y el marcador de mitosis Ph3. Se encontró que la tasa proliferativa glial se duplicó después de la ablación (T0) (Figura R7 D). Este incremento se mantuvo después de 24 horas de recuperación (T1) (Figura R7 E).



RESULTADOS.

Figura R7. Respuesta proliferativa de las células gliales ante la ablación del disco de ojo. (A, B y C) Planos basales de discos: *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* (control) (A) y *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* que fueron diseccionados inmediatamente después de la ablación (T0) (B) y después de 24 horas de recuperación (T1) (C). Los discos fueron teñidos con el marcador glial Repo en azul y el marcador mitótico Ph3 en rojo. **(A', B' y C')** Corte tangencial de un disco control (A'), un disco "T0" (B') y un disco "T1" donde además se muestra la F-actina marcada con faloidina en gris y el marcador neuronal Elav en amarillo. **(A, A')** En discos control encontramos muy pocas glías en mitosis (cabezas de flecha). **(B, B')** Cuando se dañó el disco de ojo se observó un mayor número de células gliales dividiéndose en la región basal (cabezas de flecha). **(C, C')** 24 horas después de la inducción de la herida se observó que la tasa proliferativa seguía siendo mayor que la de un disco control (cabezas de flecha). **(D, E)** Medición del índice mitótico de las células gliales en discos "T0" y "T1" comparados con su respectivo control. **(D)** El gráfico muestra el índice mitótico glial de discos control y discos con herida "T0". La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para comparar el tratamiento "T0" con su respectivo control, encontrándose que Control < *GMR>RPR* T0 con un nivel de significancia de ***= $P=0.0002$ ($n=10$ y $n=14$ respectivamente). **(E)** El gráfico muestra el índice mitótico glial de discos control y discos con herida "T1". La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para comparar el tratamiento "T1" con su respectivo control, encontrándose que Control < *GMR>RPR* T1 con un nivel de significancia de ***= $P=0.0002$ ($n=10$ y $n=14$ respectivamente).

1.7. Respuesta regenerativa glial en discos sometidos a un prolongado proceso de ablación genética.

Los resultados anteriores indican que tras un proceso de ablación genética por un periodo limitado de tiempo se promueven diferentes procesos celulares para hacer frente al daño. De manera que, se produce un aumento de la proliferación del epitelio y la inducción de una Respuesta Regenerativa Glial (RRG). Esta respuesta incluye un incremento del número de células gliales. Hemos analizado si al inducir un daño prolongado en el tiempo también ocurre la RRG. Para ello, se modificaron las condiciones del tratamiento de ablación genética. De manera que se transfirieron larvas *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* a 29°C a los 3 días de desarrollo larvario y se prolongó la inducción de la herida durante 4 días (3-4-0). Utilizando estas condiciones experimentales se observó un fuerte incremento en el índice glial en discos dañados (0.0195 ± 0.0032) comparados con los discos control (0.0099 ± 0.0023) (Figura R8 G). Este aumento es superior al que se había encontrado en discos sometidos a un proceso de ablación de sólo 24 horas (0.0150 ± 0.0031). Además, al igual que cuando se indujo apoptosis durante 24 horas, encontramos que en estas condiciones experimentales aparece un gran número de células gliales en la región apical de los discos dañados (Figura R8 D) y que la tasa de proliferación glial de los discos dañados es significativamente más alta que la de los discos control (Figura R8 H).

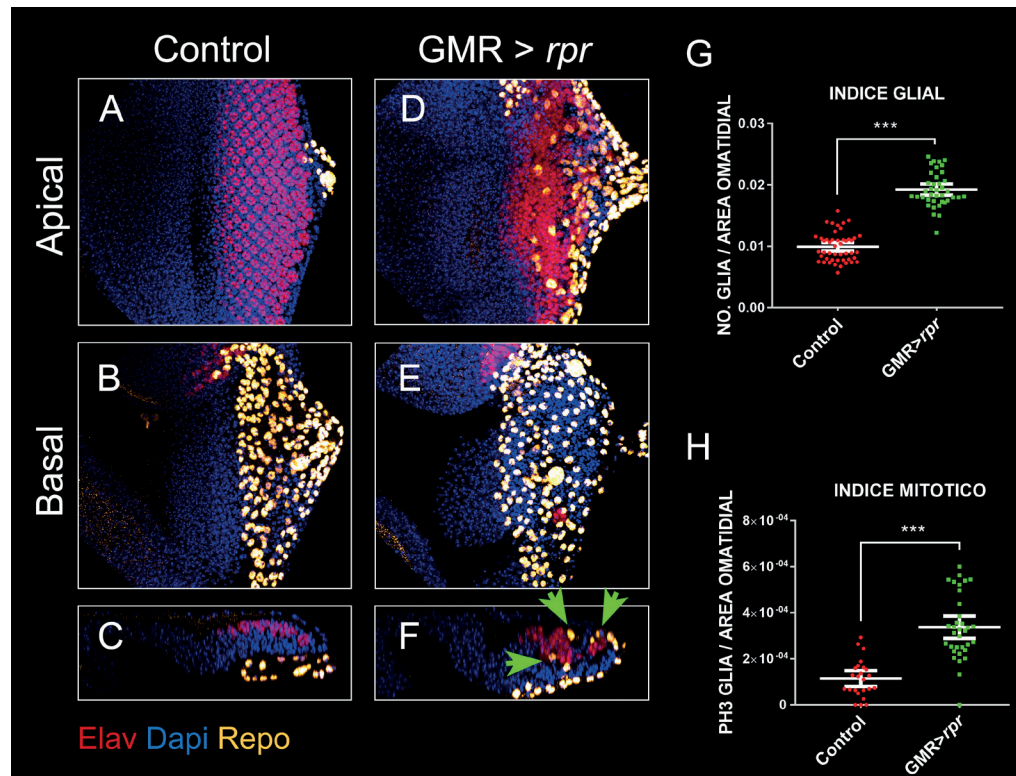


Figura R8. Incremento del número de células gliales e índice mitótico al aumentar el periodo de inducción de la herida. (A-F) Se muestra un plano apical (A, y D), basal (B y E) y un corte tangencial (C y F) de un disco de ojo control de genotipo *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* (A-C) y de un disco dañado durante 4 días (3-4-0) de genotipo *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* (D-E). Los discos fueron teñidos con el marcador glial Repo en amarillo, el marcador neuronal Elav en rojo y el marcador nuclear Dapi en azul. **(A-C)** En los discos control las células gliales migran hacia la región basal del disco (C). **(D-F)** En discos con el tratamiento 3-4-0 se observó que hay un gran número de células gliales en la región apical del disco (D y cabezas de flecha verdes en F). **(G,H)** Gráfico que muestra la densidad glial (G) e índice mitótico glial (H) en discos con ablación genética después de 3 días de desarrollo y 4 días de inducción de la herida (3-4-0) comparados con su respectivo control. **(G)** Gráfico que representa el índice glial de discos control y discos con herida. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para comparar discos control y discos con ablación genética, encontrándose que $\text{Control} < \text{GMR} > \text{RPR}$ con un nivel de significancia de $***=P<0.0001$ ($n=47$ y $n=39$ respectivamente). **(H)** El gráfico muestra el índice mitótico glial de discos control y discos con herida. La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para comparar el tratamiento 3-4-0 con su respectivo control, encontrándose que $\text{Control} < \text{GMR} > \text{RPR}$ con un nivel de significancia de $***=P<0.0001$ ($n=24$ y $n=34$ respectivamente). Las barras de error representan IC 95%.

1.8. La formación de la herida en el disco de ojo estimula el desplazamiento ectópico de la glía.

Al igual que sucede en los discos tratados durante 24 horas, encontramos que en discos dañados durante 4 días las células gliales sobrepasaban los bordes neurogénicos en la parte anterior del disco de ojo. Para cuantificar en qué medida se produce esta transgresión se ha definido la distancia a la que se encontraban las células gliales respecto al LNA del disco, marcado por la última fila de omatidios generada tras el paso del surco morfogénico (línea punteada en Figura R9 A). En la figura R9 C se esquematiza el desplazamiento glial tanto en discos control como en discos con ablación. Obsérvese

RESULTADOS.

que en los discos lesionados la glía sobrepasa la frontera neuronal (representada por el valor 0 en el gráfico). El desplazamiento ectópico se simbolizó por números positivos, mientras que la migración de la glía que no sobrepasó el límite neuronal se representó por valores negativos, la glía que se detuvo en este borde neurogénico está representada por el valor "0".

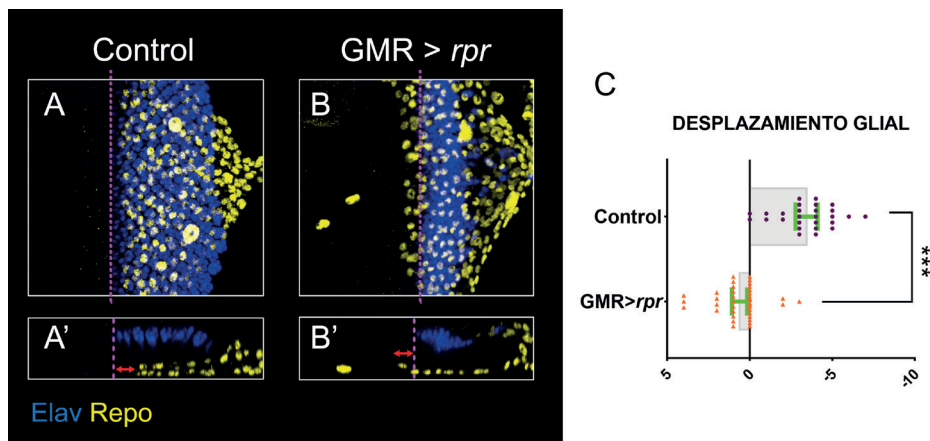


Figura R9. La ablación del disco de ojo induce migración ectópica de las células gliales. (A-B') Se muestran un disco de ojo control (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/GFP*) (A) y un disco con herida (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*) diseccionados después de 4 días de ablación genética (B) que fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul y el marcador nuclear de células gliales Repo en amarillo. A' Y B'' son cortes transversales. **(A')** La línea punteada indica el Límite Neurogénico Anterior (LNA). La flecha roja indica el umbral máximo al que migran las células gliales en condiciones normales (A') o en discos dañados (B'). **(B')** La ablación del disco provoca que las células gliales sobrepasen el umbral anterior y el LNA (línea punteada). **(C)** Medición de la distancia omatidial (No. de filas de omatidios en el eje antero-posterior) a la que se desplaza la glía. En el gráfico se representa el desplazamiento glial en condiciones normales y después de la ablación. Los números positivos representan una migración ectópica hacia la zona anterior. EL "0" representa el LNA. El test de Welch fue utilizado para comparar el tratamiento 3-4-0 con su respectivo control, encontrándose que Control < *GMR>RPR* con un nivel de significancia de ***= $P < 0.0001$ ($n=27$ y $n=39$ respectivamente). Las barras de error representan IC 95%.

Estos resultados indican que la respuesta regenerativa glial que se produce al someter los discos a daños prolongados es más fuerte que aquella producida cuando el tiempo de daño es más limitado. De manera que, este protocolo de daño es ideal para definir que rutas de señalización pueden estar regulando la RRG.

1.9. La inhibición proliferativa de la glía reduce significativamente su número en el disco imaginal de ojo.

El número total de células gliales que aparecen en los discos depende tanto de procesos proliferativos como de mecanismos de migración glial desde los lóbulos ópticos y el nervio óptico (Choi y Benzer, 1994). Los datos que hemos aportado indican que al dañar los discos se produce un incremento del

número total de células gliales. Esto podría ser una consecuencia de ambos fenómenos, por un lado, la tasa proliferativa glial aumentaría en el disco de ojo, como hemos observado (Figura R7 B), pero también es posible que se incremente el proceso de migración de las glías que se encuentran en el nervio y/o lóbulo óptico. Estas células podrían responder al estímulo regenerativo dividiéndose y/o trasladándose a la zona de la herida. Para estudiar en profundidad cuál es la contribución de la proliferación glial en el incremento de células gliales encontradas tras la ablación de los discos, en primer lugar, se ha analizado si otros marcadores del ciclo están alterados en discos dañados. Para ello, se analizó la incorporación del análogo de la timidina EdU (5-Etínil-2-deoxyuridina) en discos que han sido sometidos a un proceso de ablación durante 4 días (3-4-0). Este marcador permite analizar si tras el daño se incrementa el número de células que se encuentran en la fase de Síntesis del ciclo celular (Fase S). Nuestras observaciones indicaron que en discos dañados el número de células gliales que avanza a la fase S del ciclo (Figuras R10 B, B' y C) es mayor que en discos control (Figuras R10 A, A' y C). Sugiriendo que la inducción de muerte provoca que una mayor cantidad de glía sea capaz de responder a estímulos proliferativos.

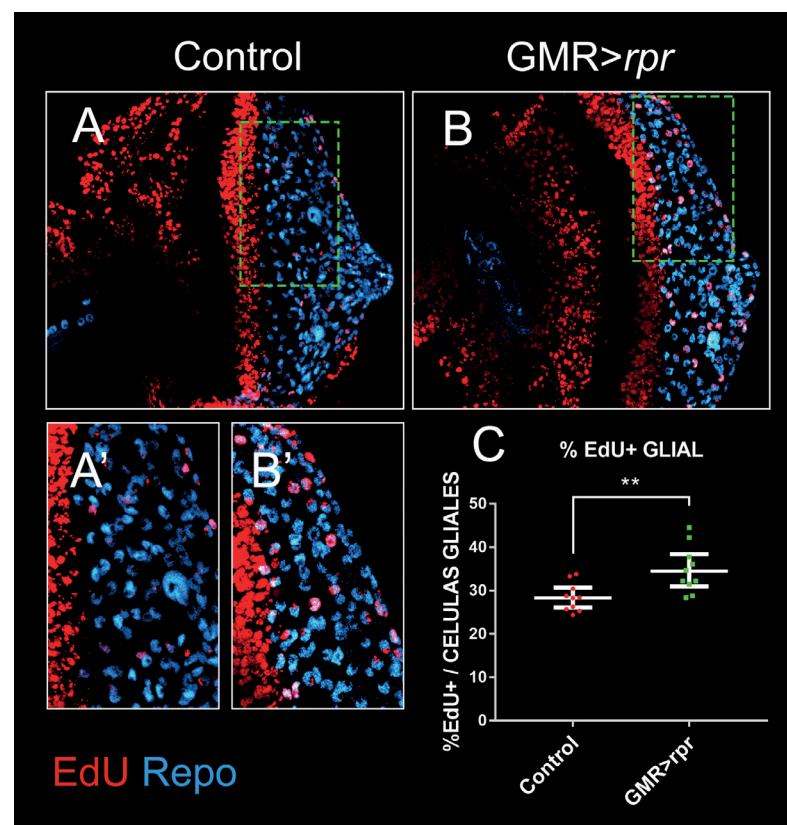


Figura R10. La ablación del disco provoca un incremento en el número de células gliales que entran en la fase S.(A-B') Distribución de células en fase S, detectada por la incorporación de EdU (en rojo), en células gliales (en azul) de discos imaginales de ojo control (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP*) y dañados durante 4 días (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*) .. (C) El gráfico muestra que el porcentaje de células gliales que incorporaron EdU en discos control es menor que en discos dañados. La prueba de Mann-Whitney fue utilizada para comparar discos dañados (GMR>RPR) con su respectivo control, encontrándose que Control < GMR>RPR con un nivel de significancia de **= $P < 0.0048$ (n=10). Las barras de error representan IC 95%.

RESULTADOS.

Con la finalidad de evaluar la contribución de los mecanismos proliferativos al incremento del número total de células gliales en discos dañados, se inhibió la capacidad proliferativa de las células gliales en discos dañados. Para esto, se combinó el sistema *Gal4/Gal80* con el sistema *QUAS/QF*. Utilizándose *UAS/Gal4* para sobreexpresar en las células gliales el regulador negativo de la transición G1-S del ciclo celular, *rbf^{CA280}* (una forma constitutivamente activa del gen *retinoblastoma*), mientras que la región posterior del disco era dañada al sobreexpresar *QUAS-rpr* con la línea *GMR-QF* (Figura R 11 A). Para ello, se utilizaron moscas con el genotipo *GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4 QUAS-rpr/UAS-rbf^{CA280}*. Como controles de discos sin dañar en los que bloqueamos proliferación se utilizaron larvas *tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4 QUAS-rpr/UAS-rbf^{CA280}* y como discos controles con daño, larvas *GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4 QUAS-rpr/+*. Estas larvas se desarrollaron a 17°C durante 8 días y fueron transferidas a 29°C durante 24 o 72 horas (ver metodología). Mediante este diseño experimental se permite que el disco se desarrolle de manera normal y que las células gliales puedan migrar y dividirse hasta inicios del tercer estadio larvario, momento en el que se forman las primeras filas de omatidios. Tras este periodo se inhibe la proliferación de la glía al pasar las moscas a temperatura restrictiva (29°C) y provocar la sobreexpresión del regulador negativo de la fase S, por lo que sólo aquellas glías que se hayan dividido antes de llegar al ojo pueden ser las que se encuentren en este tejido. La muerte se inicia cuando la línea *GMR-QF* comienza a expresarse, coincidiendo con el momento en el que empieza la diferenciación de los fotorreceptores. Utilizando este diseño experimental, se encontró que el número de glías en el disco de ojo disminuyó drásticamente cuando sólo se expresó *UAS-rbf^{CA280}* (*tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4 QUAS-rpr/UAS-rbf^{CA280}*) (Figuras R11 C y E). Cuando se indujo daño a la vez que se bloqueaba la proliferación en las células gliales retinales (*GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4 QUAS-rpr/UAS-rbf^{CA280}*) se observó que el número de glías fue mucho menor que en discos controles no dañados o en discos dañados (*GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4 QUAS-rpr/+*) (Figuras R11 D y E). Sin embargo, comparado con discos que sólo expresan *UAS-rbf^{CA280}* el número de células gliales se incrementa (Figura R11 E). Cuando la proliferación glial fue inhibida durante 72 horas se obtuvieron resultados similares (Figura R11 E). Mediante el marcador de división celular PH3 se corroboró que la división de las glías se encontraba muy reducida en discos que sobreexpresaban *rbf^{CA280}* con *repo-Gal4* durante 24 horas y se inhibió por completo en discos tratados durante 72 horas (Figura R11 F). En cuanto al desplazamiento glial, las pocas células que se encontraron en el ojo se ubicaron por detrás del borde neurogénico justo como en los discos control (Figura R11 G).

En conjunto, estas observaciones indican que el incremento de la proliferación glial juega un papel fundamental en el aumento del número de células en discos dañados. No obstante, el hecho de que la inducción del daño en discos a los que se ha bloqueado la proliferación de lugar a un incremento en el número de glías con respecto a las observadas en discos en los que únicamente se inhibió la proliferación glial, sugiere que el daño induce señales que promueven la migración de las células gliales.

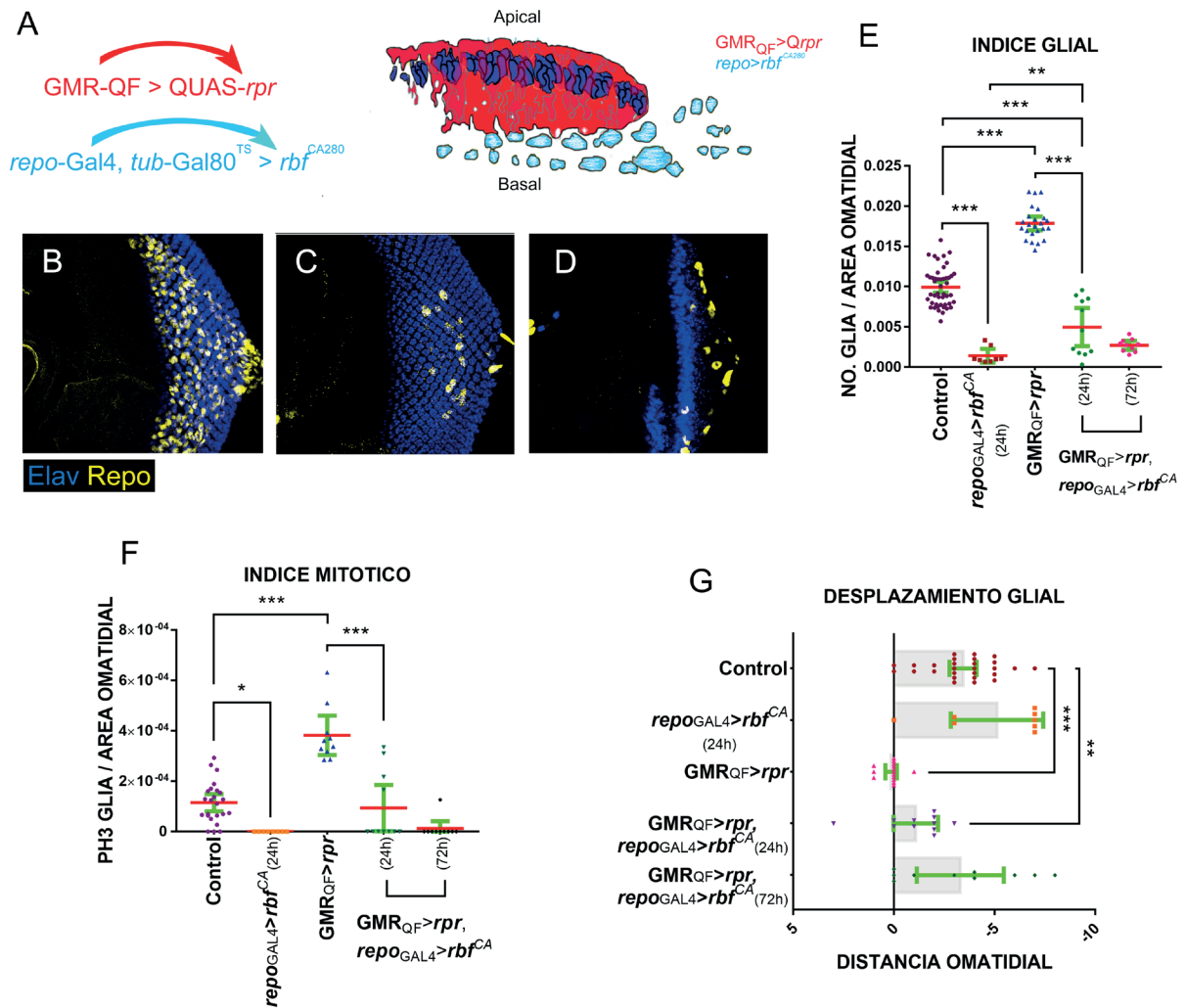


Figura R11. La sobreexpresión de *rbf^{CA280}* en las células gliales disminuye drásticamente su número e inhibe la proliferación. (A) Esquema que representa el tratamiento de ablación mediante dos sistemas de expresión genética. La línea *GMR-QF* se utilizó para inducir la ablación provocada por *rpr* en la zona neurogénica del ojo, mientras que *repo-Gal4* dirige la expresión de *rbf^{CA280}* en las células gliales. (B-D) Discos imaginales de ojo de tercer estadio larvario con los genotipos: control *GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4/+* y *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/GFP* (B), *tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4 QUAS-rpr/UAS-rbf^{CA280}* (C) y *GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4 QUAS-rpr/UAS-rbf^{CA280}* (D) teñidos con el marcador neuronal Elav en azul y el marcador de células gliales Repo en amarillo. Los tratamientos que se aplicaron fueron: 8 días de desarrollo y 1 día a 29°C (24hrs) y 4 días de desarrollo y 3 días a 29° (72hrs). Obsérvese que tras la expresión de *rbf^{CA280}* el número de células gliales disminuye notoriamente (C). Pese a la inducción de la herida, el número de glía no logra aumentar cuando se inhibe la proliferación al bloquear E2F1 con *rbf^{CA280}* (D). (E-G) Medición del número de células gliales (E), índice mitótico glial (F) y desplazamiento glial (G) de discos con los genotipos anteriores y de discos con el genotipo: control *GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; QUAS-rpr/+* con tratamientos 8-1-0 (24hrs) y 4-3-0 (72hrs). (E) Gráfico donde se representa el índice glial de discos con el genotipo mencionado anteriormente, sometidos a 24hrs de daño, y únicamente de discos con herida y sobreexpresión de *rbf^{CA280}* de 72hrs. Las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples fueron utilizadas para comparar los tratamientos: "control" > "repo-Gal4>rbf_{24hrs}", "control" > "GMR_{QF}>rpr", "control" > "GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>rbf_{24hrs}", "GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>rbf_{24hrs}" < "GMR_{QF}>rpr" y "repo-Gal4>rbf_{24hrs}" < "GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>rbf_{24hrs}" con un nivel de significancia de ***=P<0.0001 y **=P<0.0093 (n=47, n=8, n=15, n=11 respectivamente y rbf72hrs n=10). (F) Gráfico donde se representa el índice mitótico de discos con el genotipo mencionado anteriormente, sometidos a 24hrs de daño, y únicamente de discos con herida y sobreexpresión de *rbf^{CA280}* de 72hrs. Las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples fueron utilizadas para

RESULTADOS.

comparar los tratamientos: “control” > “repo-Gal4>rbf_{24hrs}”, “control” > “GMR_{QF}>rpr”, y “GMR_{QF}>rprrepo-Gal4>rbf_{24hrs}” < “GMR_{QF}>rpr”, con un nivel de significancia de * $P=0.0205$ y *** $P<0.0001$ (control $n=47$, repo-Gal4>rbf_{24hrs} $n=8$, GMR_{QF}>rpr $n=15$, GMR_{QF}>rprrepo-Gal4>rbf_{24hrs} $n=11$ respectivamente y rbf72hrs $n=10$). (G) En el gráfico se representa el desplazamiento glial de discos con genotipos mencionados con anterioridad, sometidos al 24hrs de daño, y únicamente de discos con herida y sobreexpresión de rbf^{CA280} de 72hrs. Las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples fueron utilizadas para comparar los tratamientos: “control” > “GMR_{QF}>rpr” y “control” < “GMR_{QF}>rprrepo-Gal4>rbf_{24hrs}”, con un nivel de significancia de ** $P=0.0085$ y *** $P<0.0001$ (control $n=47$, GMR_{QF}>rpr $n=8$, GMR_{QF}>rprrepo-Gal4>rbf_{24hrs} $n=15$, GMR_{QF}>rprrepo-Gal4>rbf_{24hrs} $n=11$ y rbf72hrs $n=10$). Las barras de error representan IC 95%.

1. 10. Actividad fagocítica de las Glías Wrapping.

El disco de ojo alberga dos subtipos principales de glía, las células gliales perineurales y las glía wrapping. Para caracterizar el papel que juegan estos tipos de células durante la RRG en los discos de ojo, hemos examinado su comportamiento en discos dañados. Con este fin, se indujo la ablación genética en la retina utilizando el sistema QF-QUAS y sobreexpresamos el transgén UAS-GFP bajo la regulación de la línea Mz97-Gal4 que dirige la expresión en glías wrapping (GW). El daño causa un cambio notable en el comportamiento y la morfología de estas glías. En los discos controles, las GW envían largos procesos celulares que siguen los axones a través del tallo óptico hacia el cerebro. Sin embargo, en discos GMR-QF; UAS-GFP Mz97-Gal4; QUAS-rpr dañados no observamos estos procesos en el tallo óptico. Además, el número de GW se reduce considerablemente en comparación con los discos control (Figura R12 I). Por otro lado, mientras que en los discos control, la fila anterior de la GW coincide con el borde anterior del campo glial, que está cerca del surco morfogenético, en los discos dañados la GW se localiza entre 5 y 4 filas de células por detrás de este límite y preferentemente en las capas media / apical del epitelio del disco (Figuras R12 E-F y J). Otra característica interesante de estas células es que en los discos dañados aumentan la complejidad de sus proyecciones citoplasmáticas (observadas con GFP) en comparación con las GW de discos control (Figuras R12 D-F'). Las GW transformadas extienden proyecciones membranales alargadas hacia la región dañada y parte de estas extensiones pueden ir sobre la superficie apical de los fotorreceptores (Figuras R12 F y F'). También encontramos que estas células gliales contienen múltiples vesículas en su interior con restos neuronales apoptóticos o incluso núcleos neuronales completos teñidos con el marcador neuronal Elav (Figura R12 E-F'). Por último, encontramos que los núcleos gliales de las GW transformados son consistentemente más grandes que los núcleos de GW de discos controles (Figura R12 K). En conjunto, estos datos sugieren que el daño provoca la activación de GW que expande la superficie de su membrana y genera procesos gliales que envuelven y fagocitan restos celulares y cuerpos apoptóticos.

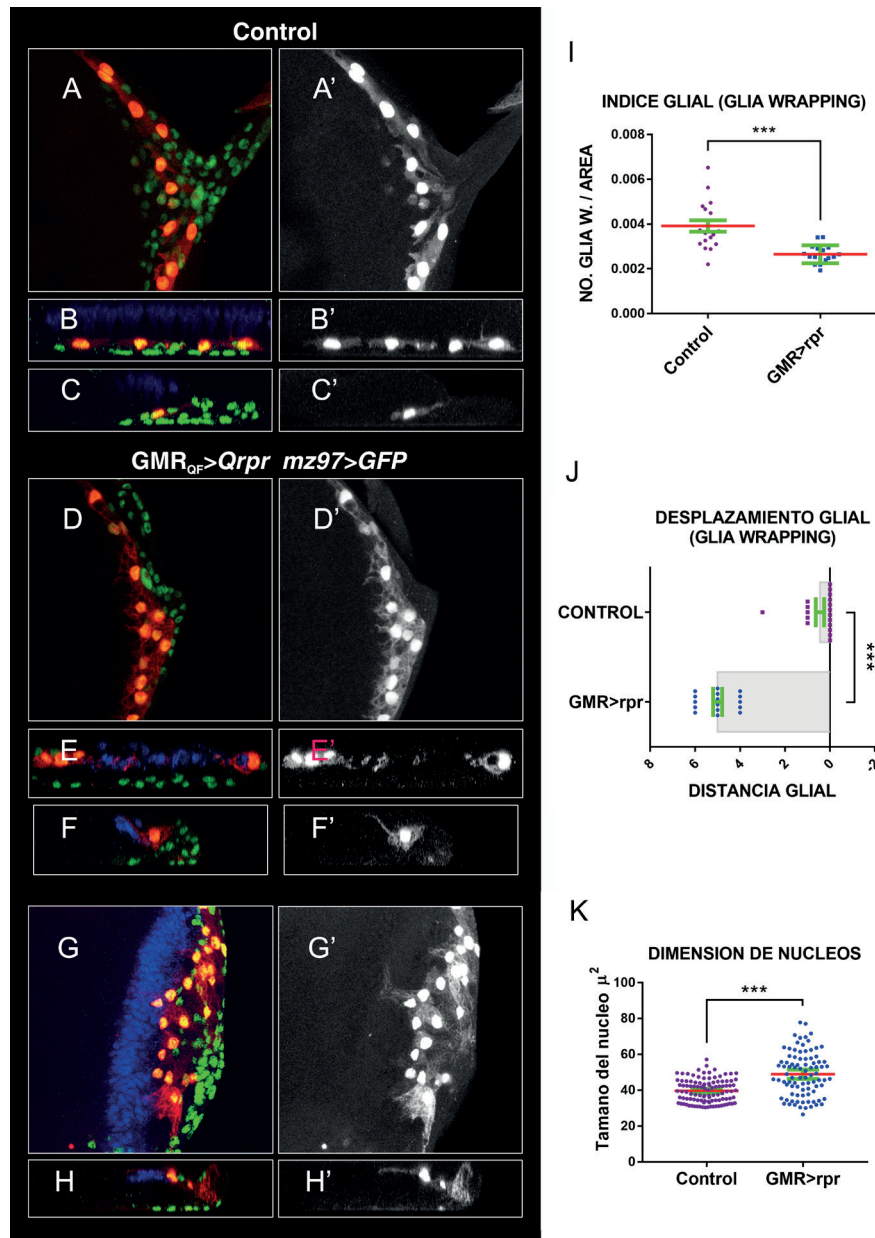


Figura R12. Actividad de las Glías Wrapping durante la ablación genética. (A-H') Se muestran discos de ojo control (*GMR-QF; mz97 UAS-GFP*) (A-C') y disco con herida (*GMR-QF; mz97 UAS-GFP; QUAS-rpr*) diseccionados después de 4 días de ablación genética (D-H') que fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul y el marcador nuclear de células gliales Repo en verde y expresan GFP en rojo. B-C', E-F' y H-H' son cortes transversales de los discos. **(I-K)** Medición del número glías wrapping (E), desplazamiento de glías wrapping (F) y tamaño de los núcleos de glial wrapping (G) de discos con los genotipos anteriores. **(I)** Gráfico donde se representa el índice glial de glías wrapping de discos con el genotipo mencionado anteriormente, sometidos a 72hrs de daño. La prueba Mann-Whitney fue utilizada para comparar los tratamientos: "control" < "GMR>rpr" con un nivel de significancia de ***= $P < 0.0001$ ($n=18$ y $n=17$ respectivamente). **(J)** Gráfico donde se representa el desplazamiento de glías wrapping de discos con el genotipo mencionado anteriormente, sometidos a 72hrs de daño. La prueba Mann-Whitney fue utilizada para comparar los tratamientos: "control" < "GMR>rpr" con un nivel de significancia de ***= $P < 0.0001$ ($n=18$ y $n=17$ respectivamente). **(K)** Gráfico donde se representa el tamaño de los núcleos de glías wrapping de discos con el genotipo mencionado anteriormente, sometidos a 72hrs de daño. La prueba Mann-Whitney fue utilizada para comparar los tratamientos: "control" < "GMR>rpr" con un nivel de significancia de ***= $P < 0.0001$ ($n=106$ y $n=88$ respectivamente). Las barras de error representan IC 95%.

RESULTADOS.

2. Reconstrucción del disco imaginal de ojo: Mecanismos de señalización involucrados en la proliferación y atracción de células gliales durante la reparación del disco imaginal de ojo.

2.1. La señalización durante la reparación del tejido ocular en *Drosophila*.

Los resultados presentados indican que cuando el disco de ojo es dañado se inicia una Respuesta Regenerativa Glial (RRG). Durante este proceso se produce un incremento del número de células gliales en el disco de ojo como consecuencia, principalmente, de un aumento en la división y migración glial desde el nervio óptico. Además, hemos observado que las GW parecen adquirir actividad fagocítica. Por lo que cuando se lesiona la retina del disco de ojo, deben de activarse diferentes señales que promueven este tipo de respuesta. Ante esto, decidimos analizar que rutas de señalización podrían estar iniciando la RRG en el disco de ojo. Como se ha descrito anteriormente, la RRG se induce por señales que deben de ser emitidas desde la región dañada, que se corresponde con la parte antero-apical del disco de ojo, sitio donde se encuentran las neuronas fotorreceptoras y las células intermatidiales. Estas señales deben de promover la proliferación y migración de las glías que se encuentran, en algunos casos, en regiones relativamente distantes, como es el nervio o el lóbulo óptico. Esto sugiere que algunas de estas señales podrían estar operando a media y larga distancia.

2.2. Efectos de la vía JNK durante la inducción de la herida en el disco de ojo y la RRG.

2.2.1. Actividad basal de la vía JNK y su hiperactivación como consecuencia de la ablación genética.

Una de las primeras señales que se activan cuando hay una lesión en el tejido la ruta de la JNK. Esta ruta se encuentra implicada en el control de la migración celular, la apoptosis y la regeneración (Soares *et al.*, 2014; Klinedinst *et al.*, 2013; Worley *et al.*, 2012; Bosch *et al.*, 2008). Por lo que decidimos analizar la posible función de esta ruta durante la activación de la RRG en el disco de ojo.

Para examinar el patrón de expresión de esta ruta en el disco de ojo durante el desarrollo normal y durante la inducción de la herida, se utilizaron dos reporteros diferentes: *TRE-GFP* (Chatterjee y Bohmann, 2012) que monitoriza la actividad de los factores de transcripción D-Jun y D-Fos, y *puc2b-LacZ* que evidencia la actividad de uno de los genes diana de la vía (*puc*). *puc2b-LacZ* fue diseñado en el laboratorio a partir de la región reguladora del gen *puc* y que puede ser utilizado para reportar la actividad de esta ruta en las células gliales (ver Figura M5).

En discos de ojo control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP*, de tercer estadio larvario, el reportero *TRE-GFP* se expresa en algunas células fotorreceptoras (Figuras 13 A, A' y flecha rosa en C-D'') y en la mayoría de las células gliales (Figuras R13 B, B' y flechas verdes en C-D'). En los núcleos de las Glías Carpet la expresión es más intensa que en el resto de las células (Figuras R13 B y B'). Esto es un fenómeno muy diferente a lo que ocurre durante el desarrollo normal de otros discos imaginales, donde la ruta se activa principalmente como respuesta al estrés. Por otro lado, hemos examinado la expresión de este reportero en discos que han sido dañados siguiendo nuestro protocolo de ablación. Con este fin se transfirieron larvas *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP* a 29°C durante 4 días. Encontramos que

en los discos de ojo de estas larvas se produce un incremento significativo de la expresión del reportero *TRE-GFP* en neuronas fotorreceptoras (Figuras R13D, D' y flecha rosa en F-F'''), células gliales (Figuras R13 E, E' y flecha rosa en F-F''') y células accesorias (flecha amarilla en F-F'').

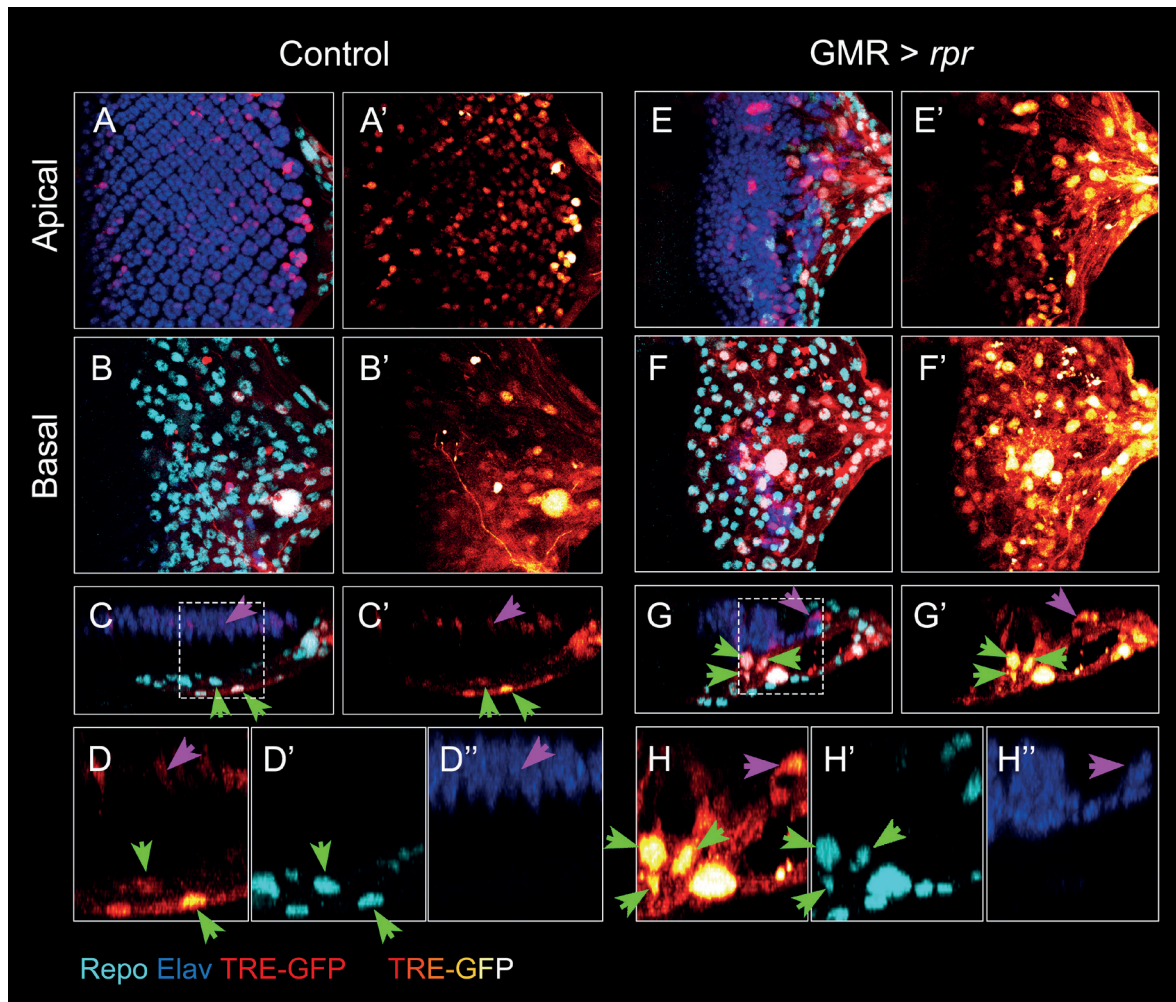


Figura R13 La vía JNK se incrementa en discos dañados. (A-H'') Discos de ojo *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP* (A-D'') y discos dañados *UAS-rpr/+;GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP* (E-H'') diseccionados después de 4 días de ablación genética. Los discos fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul y el marcador nuclear de células gliales Repo en cyan y expresan el reportero de *TRE-GFP* (en rojo en A, B, C, E, F y G y en gradiente de rojo a blanco donde la degradación hacia el blanco indica mayor concentración en A', B', C', D, E', F', G' y H). Planos apicales (A, A', E, E'), planos basales (B, B', F, F'). C-D'' y G-H'' son cortes transversales de los discos. **(A-D'')** La vía de la JNK se activa en discos de tercer estadio larvario, tanto en neuronas fotorreceptoras (A y A') como en células gliales (B y B'). La expresión del reportero se restringe a la zona apical (flechas rosas en C, C', D y D'') y a la zona basal (flechas verdes en C, C', D y D'). **(E-H'')** La inducción de la herida provoca el incremento de la expresión del reportero *TRE-GFP* en células fotorreceptoras (E) y células gliales (F). Además, promueve un incremento en la intensidad del reportero en varias células gliales denotado por el aumento del gradiente hacia el blanco (E', F' y flechas verdes en G-H').

De los diferentes reporteros generados (ver métodos) seleccionamos la línea *puc2b-LacZ* ya que se expresaba preferentemente en las células gliales, a unos niveles similares a como lo hace *TRE-GFP*.

RESULTADOS.

La señal de este reportero se localizó en las células fotorreceptoras cercanas al margen posterior del disco (Figuras R14). Nuevamente, en los núcleos de las células Carpet la expresión de la señal fue más intensa respecto al resto de células gliales. Cuando se analizaron los discos con herida, *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/puc2b-LacZ*, se encontró que la señal se intensificó en células gliales (Figuras R14). En estos discos dañados los niveles de activación de *puc2b-LacZ* eran muchos más fuerte en aquellas células gliales que se encontraban tanto en los planos mediales como en los apicales (Figuras R14).

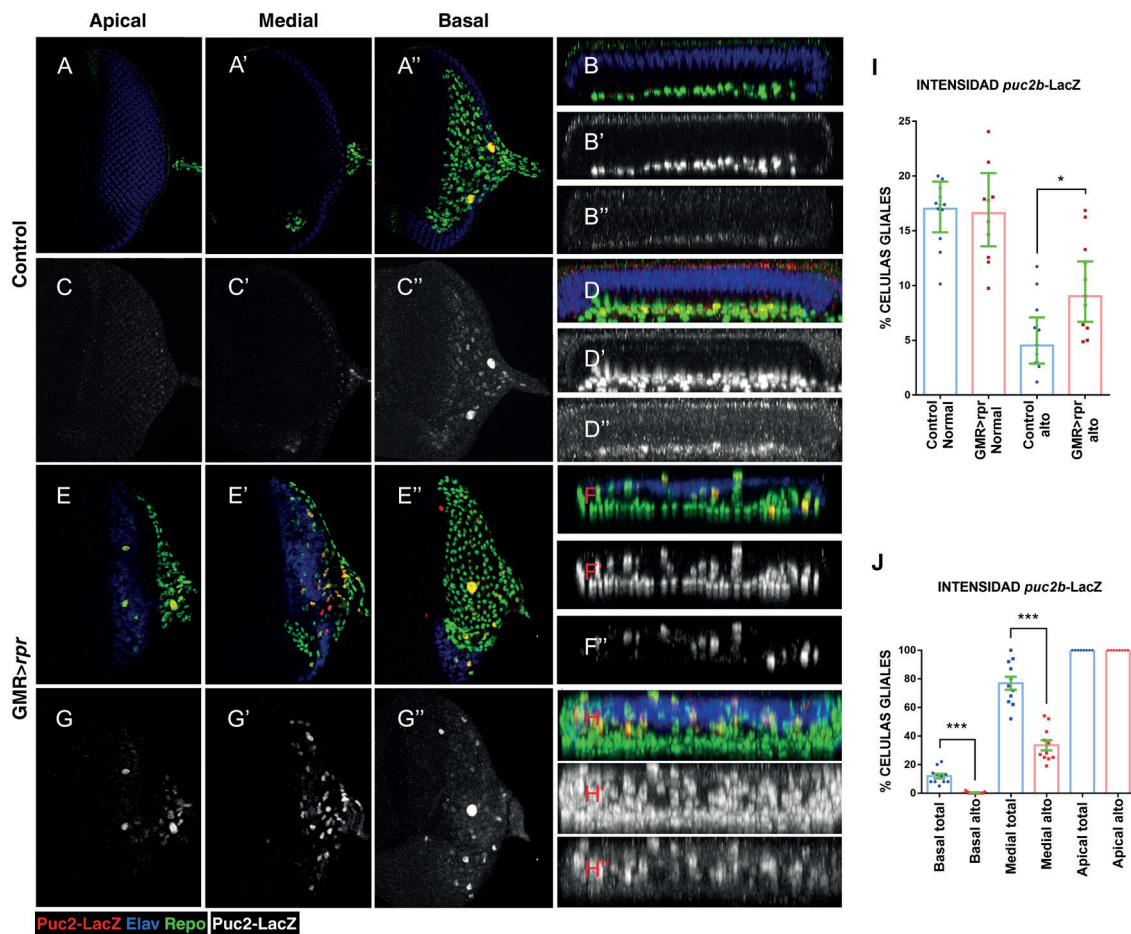


Figura R14. Activación de la vía JNK en discos control y con herida evidenciada mediante el reportero *puc2b-LacZ*. (A-H'') Se muestran discos de larvas de genotipo control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/puc2b-LacZ* (A-D'') y de genotipo *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/puc2b-LacZ* diseccionados después de 4 días de ablación genética (E-H'') que fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul, el marcador glial Repo en verde y gris en B', D', F' y H', y anti-βGal (anti-βGalactosidasa) para mostrar la expresión de *puc-LacZ* en rojo y gris en C-C'', G-G'', B'', D'', F'', H''. Se presentan cortes transversales en B- B'', D- D'', F- F'' y H- H'' (D-D'' y H-H'' son sobre-posiciones de 3 cortes transversales). (A-D'') La expresión del reportero *puc-LacZ* se observó en algunas células gliales en la parte basal del disco de ojo (B', C'' y D'') y en algunos fotorreceptores del margen posterior del disco (C). (D-H'') En discos con herida se incrementó el número de glías que expresaron el reportero, en comparación con el control. Las glías que expresan el reportero se encuentran en planos apicales (G), mediales (G') y basales (G''). Las glías con una mayor expresión del reportero se localizan en su mayoría en planos mediales y apicales (F' y H'). (I) Medición de intensidad de la señal del reportero *puc2b-LacZ*. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para comparar "GM-R>rpr alto" > "Control alto" n=12. Encontrándose un incremento en la cantidad de glías que expresan *puc2b-LacZ* a niveles

altos. **(J)** Medición de la cantidad de células que expresan el reportero a niveles altos. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney para comparar “Medial total” > “Medial alto”. En el gráfico se observa que los discos dañados presentan un incremento del % de células gliales que expresan *puc2b-LacZ* a niveles altos. De todas las células que expresan *puc2b-LacZ*, aquellas que están en planos medios o apicales presentan una mayor intensidad en la señal del reportero. *= $P=0.014$ ***= $p=.0001$

2.2.2. La inhibición de la ruta JNK en el disco de ojo o en las células gliales puede alterar la migración de estas células.

Los resultados mencionados hasta ahora indican que cuando los discos son dañados se produce un incremento de la ruta de la JNK en la zona dañada y en las células gliales. Considerando que se ha propuesto que esta ruta tiene un papel fundamental regulando procesos celulares como lo son la migración celular o la activación de la proliferación compensatoria durante la regeneración (Igaki *et al.* 2006; Bosch *et al.* 2005; Pastor-Pareja *et al.* 2004), es posible que esta ruta pueda estar promoviendo la respuesta regenerativa glial que hemos descrito previamente. Para estudiar la posible función de la JNK en la activación de la RRG en el disco de ojo hemos modificado la actividad de esta ruta a la vez que inducimos daño.

En primer lugar, se bloqueó la función de la JNK en la región donde se indujo daño sobreexpresando con la línea *GMR-Gal4* una forma dominante negativa de la quinasa Basket (*UAS-bsk^{DN}*) a la vez que se expresaba *UAS-rpr*. Esta quinasa está implicada en la ruta de transducción de la JNK fosforilando a los factores de transcripción c-Jun y c-Fos. Para esto se utilizaron larvas con el genotipo *UAS-bsk^{DN}/UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* (Figura R15 B). Estas larvas fueron transferidas durante 4 días a 29°C para inducir la ablación genética y a la vez sobreexpresar *UAS-bsk^{DN}*. De este modo, se encontró que el incremento de células gliales que se produce al dañar discos con *UAS-rpr* (*UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*) es parcialmente suprimido cuando *UAS-bsk^{DN}* es coexpresado. De tal forma, que la densidad glial en discos *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* es significativamente mayor que en discos en los que se bloqueó la JNK y se indujo daño (Figuras R15 A, D y E). También se observó que en estos discos los defectos en la migración glial previamente descritos en discos dañados son parcialmente corregidos (Figuras R15 C, D, y F). Estos resultados sugieren que la función de la vía JNK es requerida en la región dañada para emitir una señal que promueva la respuesta regenerativa glial. Los discos en donde sólo se sobreexpresó *UAS-bsk^{DN}* con *GMR-Gal4* (*UAS-bsk^{DN}; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*) no presentaron cambios en el número de glías o anomalías en su desplazamiento respecto a su control (*GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4/+* y *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP*).

RESULTADOS.

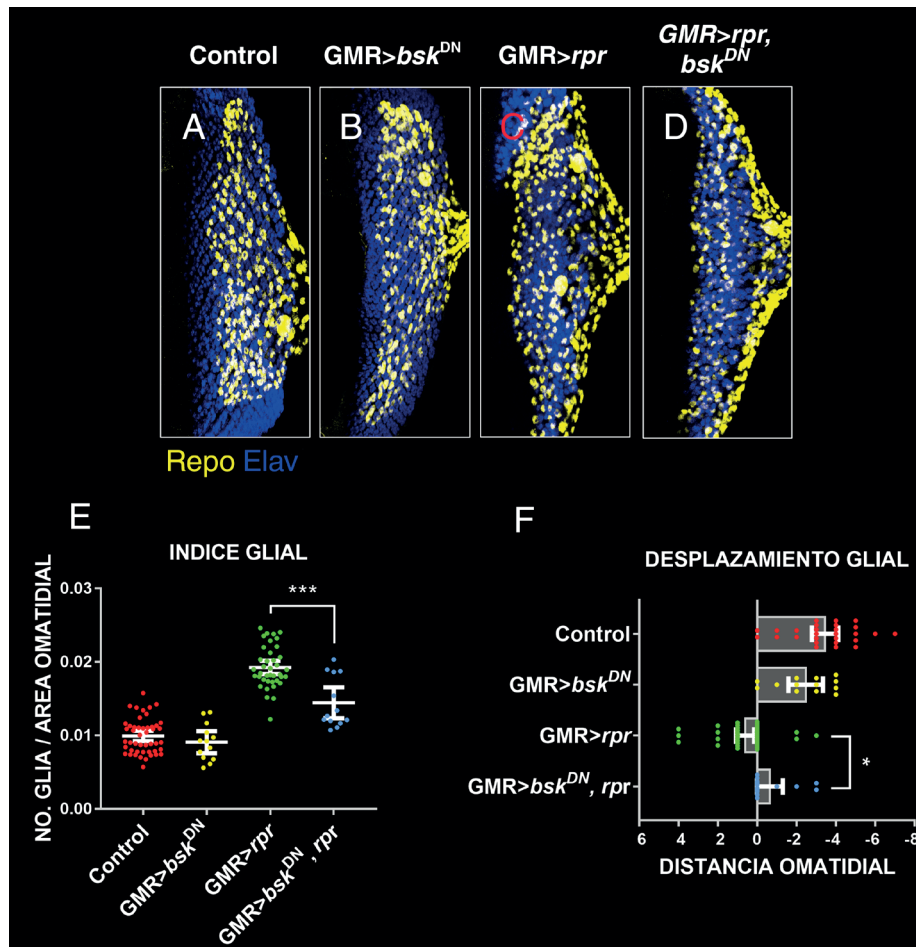
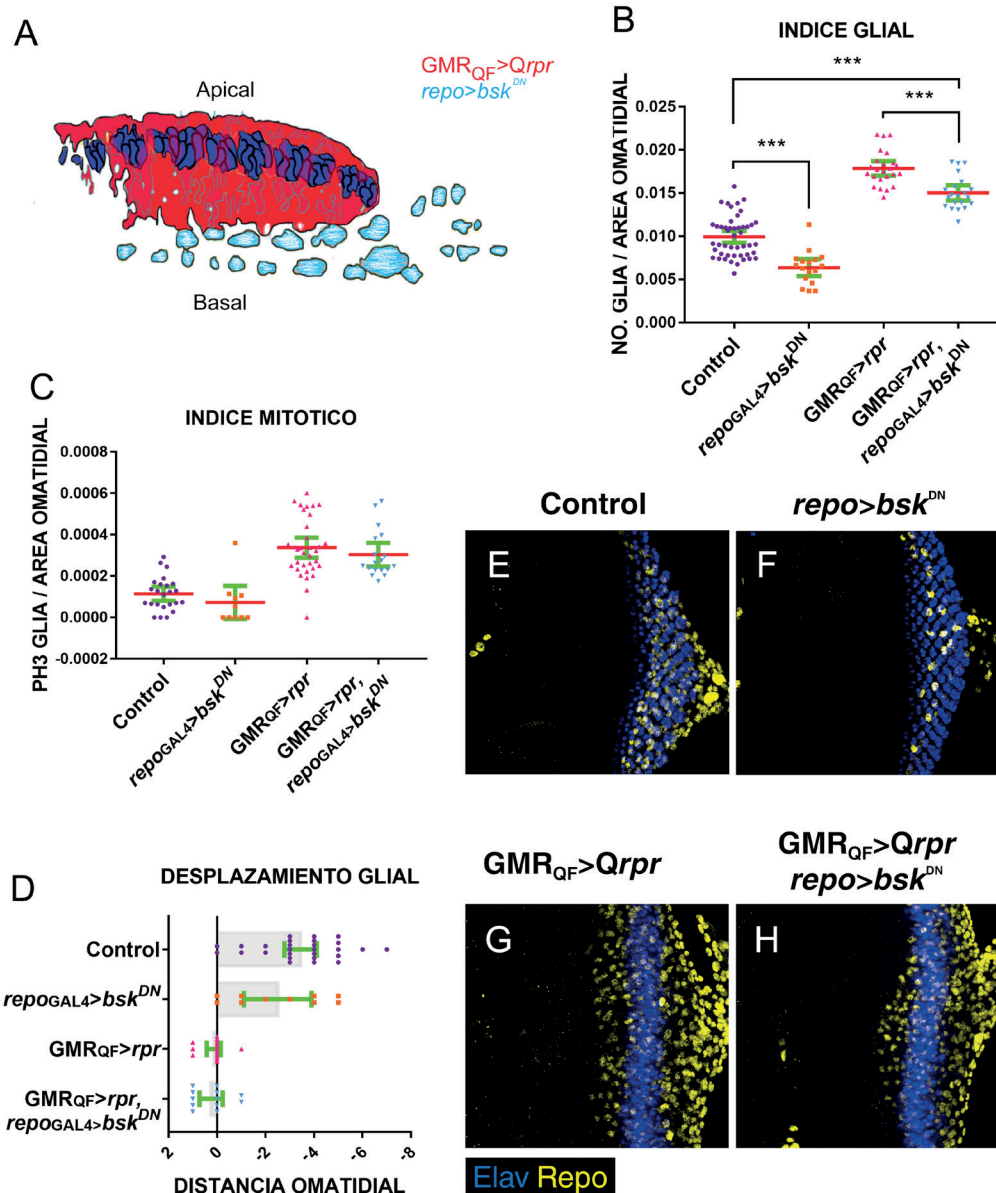


Figura R15. La regulación negativa de la JNK en discos de ojo mediante la expresión de *UAS-bsk^{DN}* con *GMR-Gal4* reduce los efectos de la Respuesta Regenerativa Glial. Los discos de larvas *UAS-bsk^{DN}/UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* (B) y *UAS-bsk^{DN}/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* (D) sometidos al protocolo 3-4-0 fueron teñidos junto a sus respectivos controles (A y C) con los marcadores Elav en azul y Repo en amarillo. **(A-D)** Los discos en los que se sobreexpresó *UAS-bsk^{DN}* (B) no presentaron cambios en el número de células gliales respecto a su control (A). Los discos con co-expresión de *UAS-rpr* y *UAS-bsk^{DN}* (D) presentaron un menor número de células gliales respecto a los discos *UAS-rpr* (C). **(E-F)** Gráficos que muestran la densidad glial (E) y el desplazamiento glial (F) de discos con los genotipos anteriores con tratamiento 3-4-0. **(E)** Estimación del índice glial de los genotipos anteriores. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar los tratamientos: “control” = “*GMR>bsk^{DN}*” y “*GMR>rpr*” < “*GMR>bsk^{DN} rpr*”, con un nivel de significancia de ***=*P*=0.005 (*n*=47, *n*=14, *n*=39, *n*=13 respectivamente). **(F)** Medición de la distancia omatidial que recorre la glía. El test de Mann-Whitney fue utilizado para comparar “control” = “*GMR>bsk^{DN}*” y “*GMR>rpr*” < “*GMR>bsk^{DN} rpr*”, con un nivel de significancia de ***=*P*=0.008 (*n*=47, *n*=14, *n*=39, *n*=13 respectivamente). Las barras de error representan IC 95%.

También se examinó si la ruta de la JNK podría ser requerida en las células gliales y no sólo en la región dañada. Para ello, se combinó nuevamente el sistema *QF/QUAS* para inducir daño con *GMR-QF* y el sistema *Gal4/UAS* para bloquear la ruta de la JNK en la glía con *repo-Gal4* (Figura R16 A). En nuestro diseño experimental se transfirieron larvas *GMR-QF/UAS-bsk^{DN}; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4/QUAS-rpr* a 29°C por 4 días (Figura R16 H). Al compararse con larvas control dañadas *GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4/QUAS-rpr* (Figura R16 G) que fueron tratadas siguiendo el mismo protocolo se encontró que

hubo una fuerte reducción en el número de células gliales que se acumulan en la retina en respuesta al daño (Figura R16 B). Sin embargo, no se observaron alteraciones en la tasa proliferativa de las glías (Figura R16 C), ni tampoco se encontró que el comportamiento migratorio estuviera alterado (Figuras R16 D y H). La sobreexpresión de *UAS-bsk^{DN}* con *repo-Gal4* (*UAS-bsk^{DN}/+; repo-Gal4/+*) (Figura R16 F) fue suficiente para reducir el número de células gliales que aparecen normalmente en discos de ojo controles que no han sido dañados (Figura R16 E).

A la vista de estos resultados se puede concluir que la ruta de la JNK es requerida tanto en la región dañada como en las células gliales para promover la respuesta regenerativa glial. Por otro lado, la función de la JNK parece que es necesaria únicamente para promover la migración de la glía, pero no para inducir la proliferación de estas células. Cabe mencionar que si bien *bsk^{DN}* disminuye el número de glías al sobreexpresarse tanto en las células gliales como en el disco de ojo (ver Figura R15), no elimina por completo el efecto causado por la ablación (Figura R16 B), lo que indicaría que existen otros mecanismos que promueven la migración glial hacia el disco de ojo.



RESULTADOS.

Figura R16. La ruta de la JNK es requerida en las células gliales para promover la RRG. (A) Representación esquemática del tratamiento de ablación mediante dos sistemas de expresión genética. La línea *GMR-QF* se utilizó para inducir la ablación provocada por *rpr* en la zona neurogénica del ojo, mientras que *repo-Gal4* dirige la expresión de *bsk^{DN}* en las células gliales. **(B-D)** Representaciones gráficas que muestran el número de células gliales (B), el índice proliferativo (C) y el desplazamiento glial (D) de discos con los genotipos *GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4/+* (Control), *UAS-bsk^{DN}/+; repo-Gal4/+* (*repo>bsk^{DN}*), *GMR-QF/+; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4/QUAS-rpr* (*GMR_{QF}>rpr*) y *GMR-QF/UAS-bsk^{DN}; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4/QUAS-rpr* (*GMR_{QF}>rpr repo-Gal4*). **(B)** Gráfico donde se representa el índice glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: “control” > “*repo-Gal4>bsk^{DN}*”, “*GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>bsk^{DN}*” < “*GMR_{QF}>rpr*” y “control” < “*GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>bsk^{DN}*” con un nivel de significancia de ***= $P < 0.0001$ (control $n=47$, *repo-Gal4>bsk^{DN}* $n=17$, *GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>bsk^{DN}* $n=21$ y *GMR_{QF}>rpr* $n=24$ respectivamente). **(C)** Estimación de la proliferación glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar los tratamientos: “control” = “*repo-Gal4>bsk^{DN}*” y “*GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>bsk^{DN}*” = “*GMR_{QF}>rpr*” ***= $P=0.2451$ (control $n=47$, *repo-Gal4>bsk^{DN}* $n=17$, *GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>bsk^{DN}* $n=21$ y *GMR_{QF}>rpr* $n=24$). **(D)** Medición del desplazamiento glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar los tratamientos: “control” = “*repo-Gal4>bsk^{DN}*” y “*GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>bsk^{DN}*” = “*GMR_{QF}>rpr*” $P=0.2379$ y 0.5675 (control $n=47$, *repo-Gal4>bsk^{DN}* $n=17$, *GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>bsk^{DN}* $n=21$ y *GMR_{QF}>rpr* $n=24$). Las barras de error representan IC 95%. **(E-H)** Discos de los genotipos anteriores teñidos con los marcadores Elav en azul y Repo en amarillo. El número de células gliales en discos *UAS-bsk^{DN}/+; repo-Gal4/+* (F) y *GMR-QF/UAS-bsk^{DN}; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4/QUAS-rpr* (G) disminuyó en comparación de sus respectivos controles.

Una posible explicación acerca del mecanismo que podría activar la ruta de la JNK en las células gliales desde la región dañada, es que las células de la región dañada secreten el ligando de la ruta Eiger (Egr). De hecho, observamos, mediante tinciones con anticuerpos contra Eiger, que en discos donde se indujo ablación los niveles de este ligando parecen incrementarse (Figura R17). Para estudiar el posible requerimiento de Eiger para activar a la JNK en las células gliales se indujo la ablación genética a la vez que se sobreexpresó un ARN de interferencia para este ligando con la línea *GMR-Gal4 (UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-egr^{ARNi}/+)*. Sin embargo, esta condición no produjo cambios en el número de glías o en su desplazamiento respecto a las glías de discos control (Figuras R18 A, B, E y F). Para confirmar que Egr no es requerido para inducir la RRG en el disco de ojo se analizaron larvas mutantes con alelos de falta de función de *egr* a la vez que se inducía la ablación genética bajo la regulación de *GMR-QF*. En los discos mutantes *egr¹/egr³* a los que se les indujo daño se observó que tampoco presentaron cambios significativos en el número glías. Sólo se observó una desregulación en el desplazamiento de estas glías al compararse con sus respectivos controles (Figuras R18 C-F).

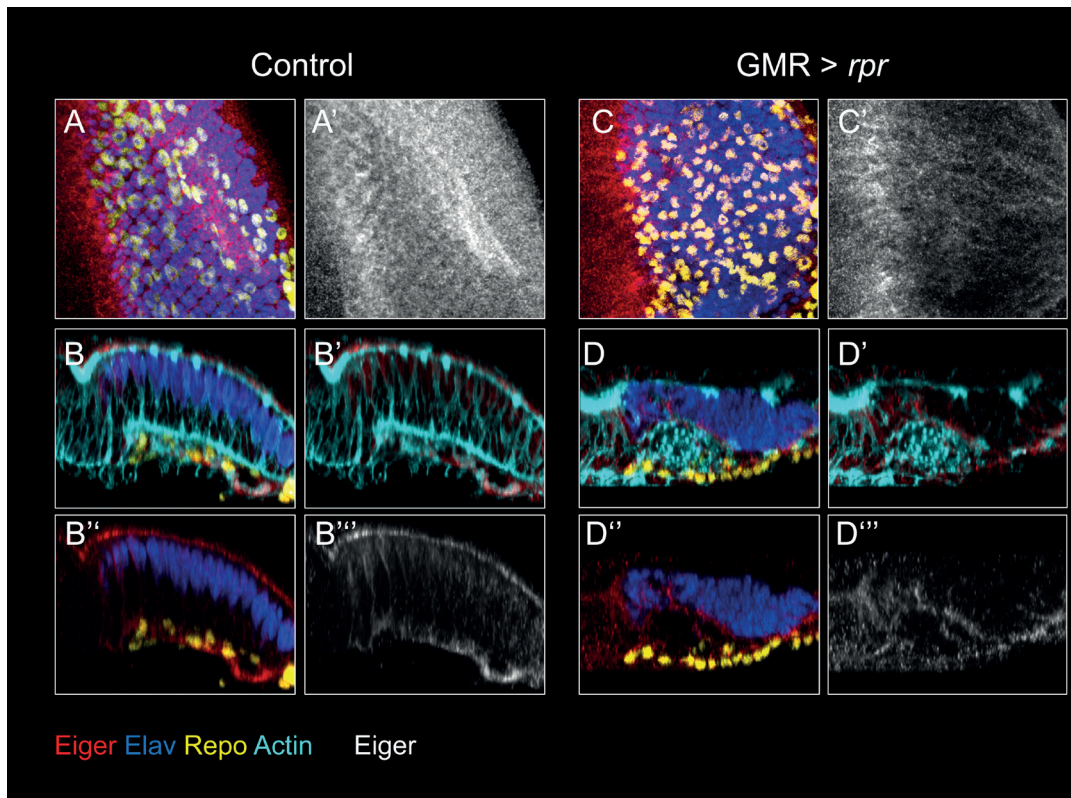
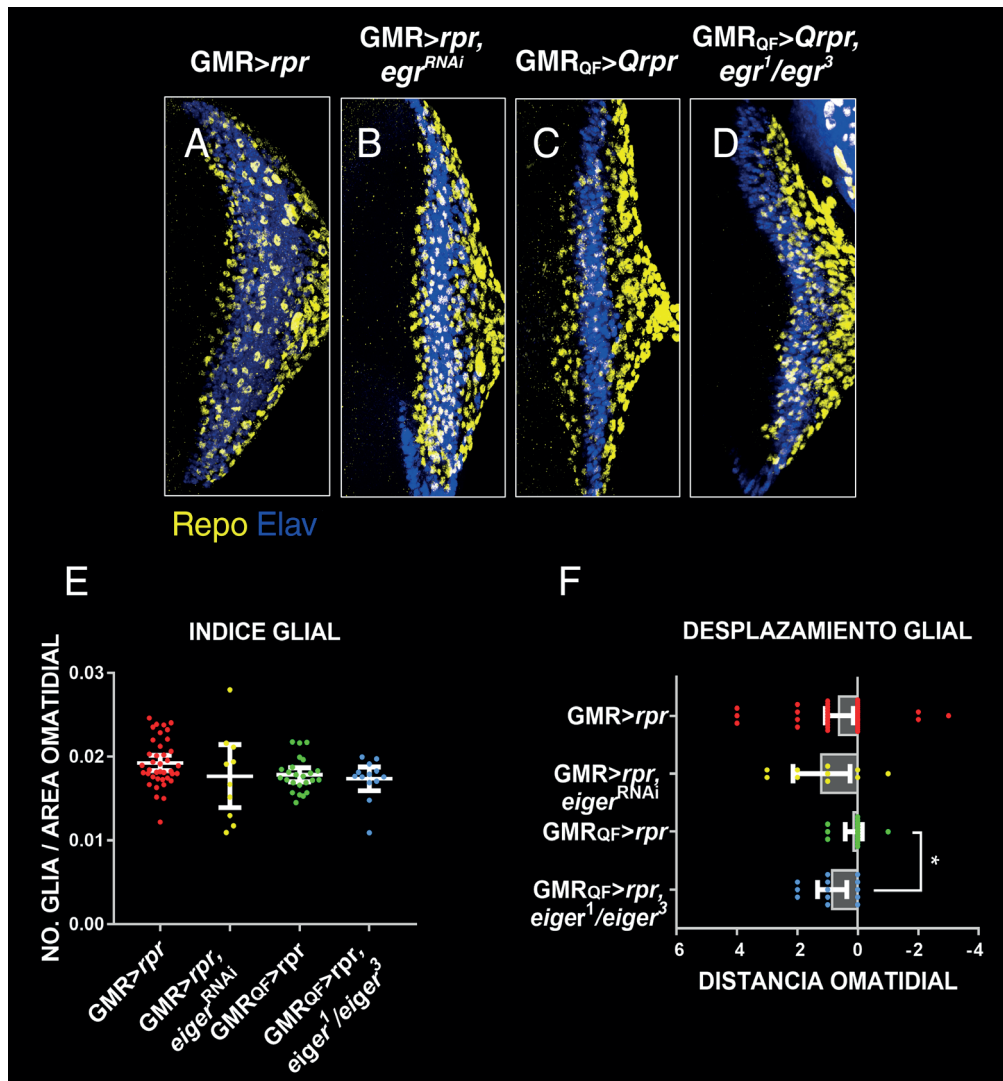


Figura R17. Patrón de expresión del ligando de la vía JNK Eiger en discos control y discos con herida. Discos de larvas control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* (A-C') y de genotipo *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}* (D-F') diseccionados después de 4 días de ablación genética que fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul, el marcador glial Repo en amarillo, Faloidina en cyan y anti-Eiger en rojo y gris en A', C' D' y F'. **(A-C')** La señal del anticuerpo se observó en algunas células fotorreceptoras cercanas al SM, en la región basal y en el margen apical del disco de ojo. **(D-F')** En discos con daño la señal se distribuyó en regiones mediales cercanas a la herida.

Figura R18. El ligando Eiger no es requerido para inducir la RRG en el disco de ojo. Los discos de larvas *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*; *UAS-egr^{ARNi}/+* (B) y *GMR-QF/+; egr¹/egr³; repo-Gal4/QUAS-rpr* (D) teñidos junto a sus respectivos controles (A y C) con los marcadores Elav en azul y Repo en amarillo. **(A-D)** Los discos con sobreexpresión de *UAS-rpr* y *egr^{ARNi}* (B) no presentaron cambios en el número de células gliales respecto a discos control dañados (A). En los discos mutantes *egr¹/egr³* a los que se indujo daño con el sistema *QF/QUAS* (D) no se encontraron cambios en el número de células gliales respecto a los discos dañados con *QF/QUAS* (C). **(E-F)** Gráficos que muestran el número de células gliales (E) y el desplazamiento glial (F) de discos con los genotipos anteriores bajo el protocolo 3-4-0. **(E)** Estimación del índice glial de los genotipos anteriores. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar los tratamientos: "*GMR>rpr*" = "*GMR>UAS-egr^{ARNi}, rpr*" y "*GMRQF>rpr*" = "*GMRQF>rpr, egr¹/egr³*", $P=0.3203$ y $P=0.9938$ (*GMR>rpr* n=39, *GMR>UAS-egr^{ARNi}, rpr* n=10, *GMRQF>rpr* n=24, *GMRQF>rpr, egr¹/egr³* n=13). **(F)** Medición de la distancia omatidial que recorre la glía. El test de Mann-Whitney fue utilizado para comparar "*GMR>rpr*" = "*GMR>UAS-egr^{ARNi}, rpr*" y "*GMRQF>rpr*" < "*GMRQF>rpr, egr¹/egr³*", con un nivel de significancia de $*=P=0.0177$ (*GMR>rpr* n=39, *GMR>UAS-egr^{ARNi}, rpr* n=10, *GMRQF>rpr* n=24, *GMRQF>rpr, egr¹/egr³* n=13). Las barras de error representan IC 95%

RESULTADOS.



En discos de ojo de moscas mutantes egr^1/egr^3 , el número de glía y el índice proliferativo glial no varió respecto a discos controles (Figuras R21 A, B, G y H). Esto sugiere que la regulación del número de glías en el disco de ojo no depende de la activación canónica de la ruta JNK. Sin embargo, en estos discos mutantes se encontró que las células gliales no migraron con normalidad hacia la región anterior del disco, como ocurre en discos silvestres, en donde las glías llegan cerca del SM (Figura R21 I), por lo que el papel del ligando Egr en la regulación de la migración glial no queda descartado del todo.

2.2.3 Efectos de la sobreexpresión de *eiger* en el disco de ojo.

Para investigar más en detalle los posibles efectos de Eiger sobre la migración y activación de la ruta JNK en las células gliales, sobreexpresamos este ligando en el disco de ojo y analizamos el índice glial y la actividad de algunos reporteros de la JNK en la glía. Para ello, sobreexpresamos *UAS-eiger* durante 4 días usando la línea *GMR-Gal4* y analizamos la actividad de *TRE-GFP* (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP; UAS-eiger/+*). De esta forma, se encontró que la sobre-expresión de *UAS-eiger* en el disco de ojo incrementó la señal del reportero *TRE-GFP* en la región correspondiente a la retina, donde se expresa la

línea *GMR-Gal4* pero no en las células gliales (flechas rosas en Figuras R19 F y F'). Solamente se registró un incremento no autónomo de la actividad del reportero en la región apical del disco, probablemente en las células peripodiales (flechas verdes en Figuras R19 D, D', F y F').

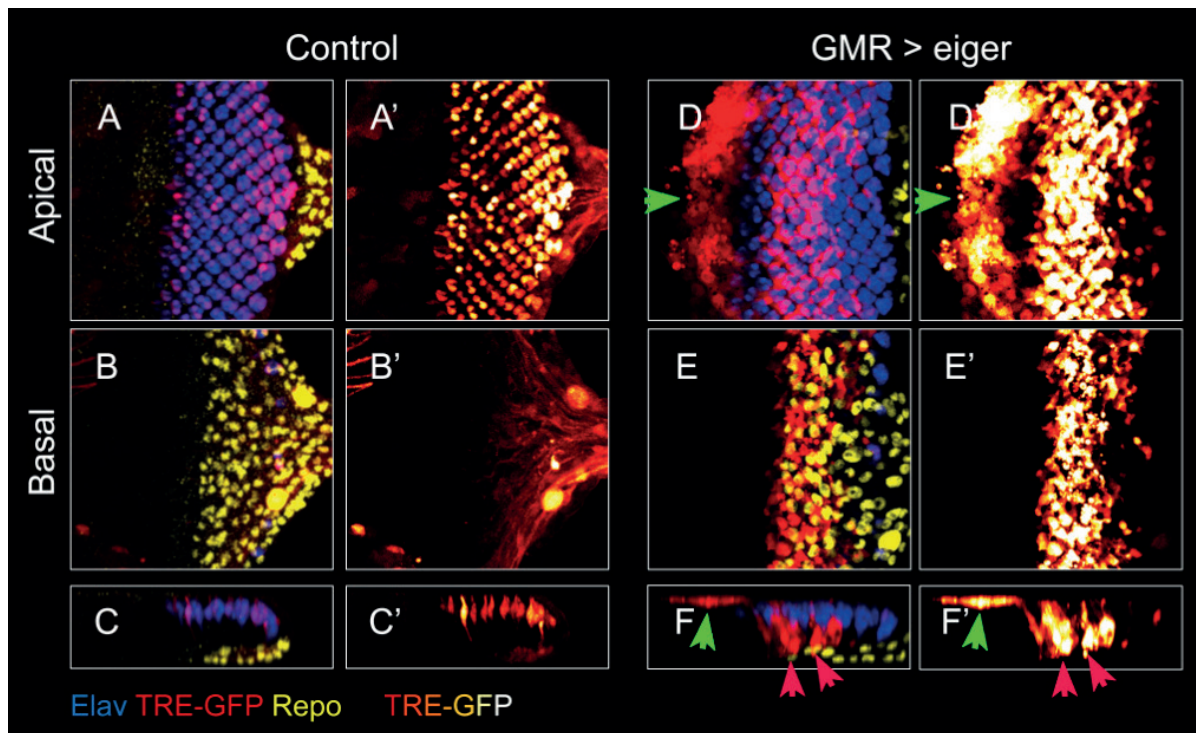


Figura R19. La sobreexpresión de *UAS-eiger* en el disco de ojo con *GMR-Gal4* no es suficiente para activar a la vía JNK en las glías. (A-F') Discos de ojo control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP* (A-C') y en los que sobreexpresamos *UAS-eiger* (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP; UAS-egr*) (D-F') diseccionados tras 4 días de sobreexpresión, que fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul y el marcador nuclear de células gliales Repo en cyan y que expresan el reportero de *TRE-GFP* (en rojo en A, B, C, D, E, F y en gradiente de rojo a blanco donde la degradación hacia el blanco indica mayor concentración en A', B', C', D, E', F'). Planos apicales (A, A', D, D'), planos basales (B, B', E, E'). C-C' y F-F' son cortes transversales de los discos. (D-F') La sobreexpresión de *UAS-egr* en el disco de ojo provocó el incremento de la señal del reportero *TRE-GFP* en células fotorreceptoras (D) pero no en las células gliales (F').

A diferencia de lo ocurrido con el reportero *TRE-GFP*, la sobreexpresión de *eiger* en el disco de ojo no provocó ningún cambio en el patrón del marcador *puc2b-LacZ* (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/puc2b-LacZ; UAS-egr/+*) (Figuras R20 D-F'). Este resultado apoya la idea de que la sobreexpresión de *eiger* en las células del disco no es suficiente para activar a la ruta en las células gliales. El hecho de que este reportero no se exprese en la región del ojo en respuesta a la activación de *eiger*, probablemente se debe a que el dominio que hemos utilizado para generarlo, no contiene los elementos reguladores necesarios para que se active en la región del disco.

Finalmente se analizó el índice y el desplazamiento glial de discos con sobreexpresión de *eiger*, pero no se encontraron cambios significativos con respecto a los discos control (Figuras R20 G y H). Esto

RESULTADOS.

indica que la expresión del ligando Eiger en el disco no es capaz de activar la vía JNK en la glía ni de incrementar su número. Por lo que debe de existir otro mecanismo que active de manera no canónica la vía JNK en las células gliales.

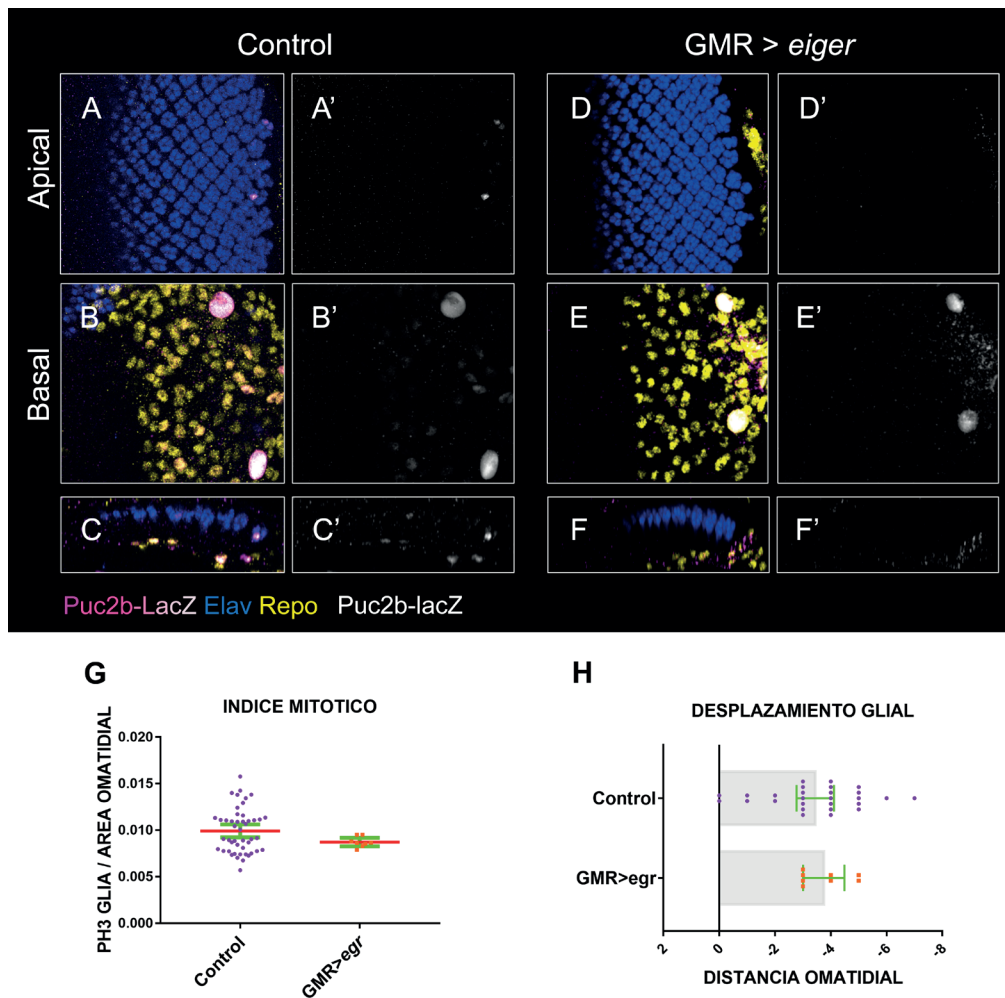


Figura R20. La sobreexpresión de *eiger* en el disco de ojo no es suficiente para activar a la vía JNK ni a la RRG. (A-F') Se muestran discos de larvas control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/puc2b-LacZ* (A-C') y discos en los que se ha sobreexpresado *eiger* *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/puc2b-LacZ; UAS-egr/+* (D-F') sometidas al protocolo 3-4-0 y que fueron teñidos con el marcador neuronal *Elav* en azul y el marcador glial *Repo* en amarillo y anti-βGal (anti-βGalactosidasa) para mostrar la expresión de *puc-LacZ* (gradiente de rosa a blanco en A-F y gris en A'-F'). C, C', F y F' son cortes transversales. **(D-F')** En discos con sobreexpresión de *UAS-egr* no se registraron cambios en la señal del reportero en comparación con el control (A-C'). **(G-H)** Gráficos donde se representan la densidad (G) y el desplazamiento glial (H) de discos con los genotipos anteriores bajo el protocolo 3-4-0. **(G)** Medición del índice glial de los genotipos anteriores. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar el tratamiento: "Control" = "*GMR>UAS-egr*", P=0.2819 (n=47 y n=8, respectivamente). **(F)** Medición de la distancia omatidial que recorre la glía. El test de Mann-Whitney fue utilizado para comparar "Control" = "*GMR>UAS-egr*", P=0.7656 (n=47 y n=8, respectivamente). Las barras de error representan IC 95%

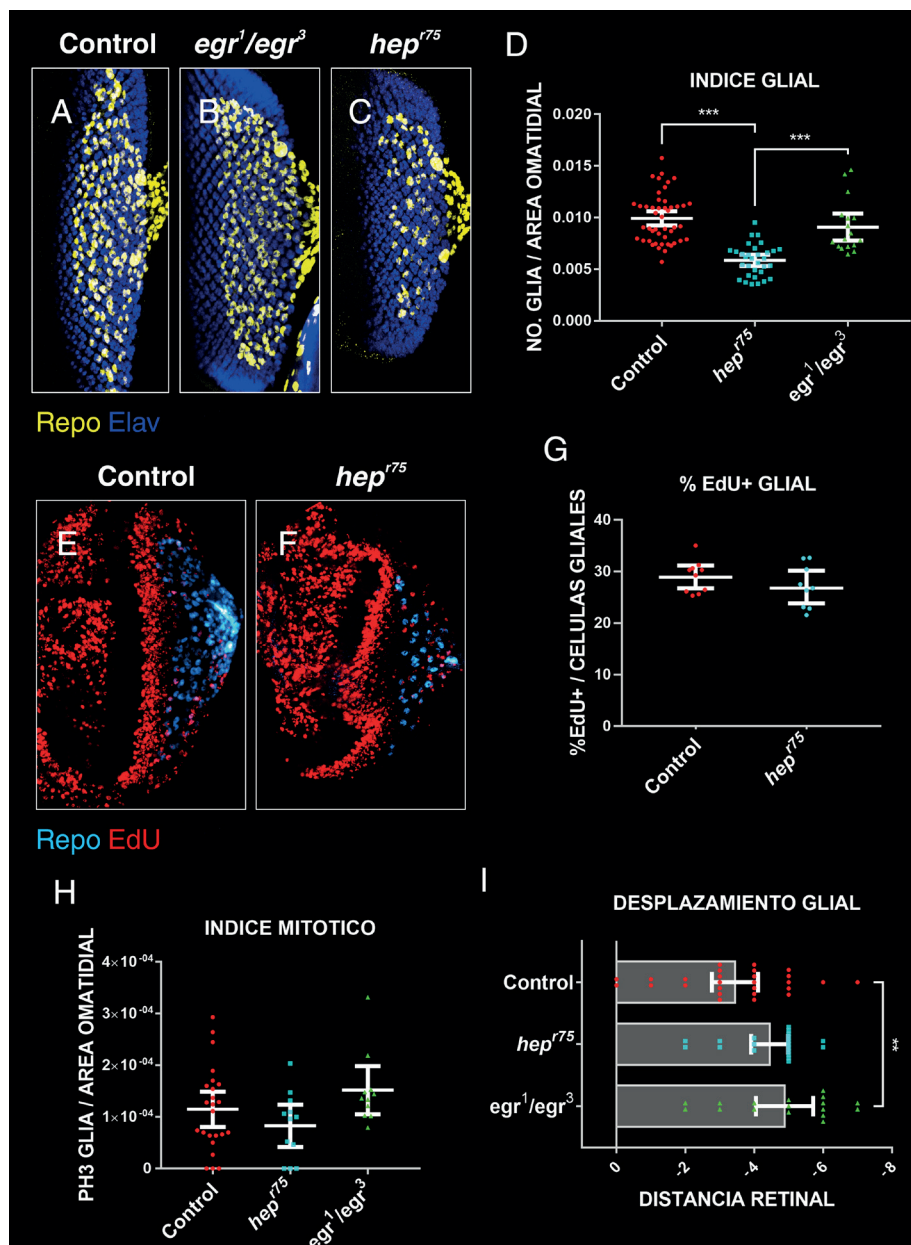
2.2.4. Reducción del número de células gliales en discos de ojo con fondo mutante *hep^{r75}*.

En conjunto, los resultados anteriores indican que mientras *Bsk* afecta a la RRG, otros miembros de esta ruta, como *eiger*, no lo hacen, sugiriendo que esta ruta puede ser activada durante la RRG de una forma no canónica. Para profundizar más en cómo esta ruta es regulada durante la RRG, se decidió examinar la función de *hep*. Ésta quinasa puede ser activada por otros elementos no canónicos de la vía JNK en respuesta al daño en el SN (Soares *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2010; Ayaz *et al.*, 2008; Horiuchi *et al.*, 2007). Analizamos discos de ojo para el alelo mutante *hep^{r75}* y encontramos que el número de células gliales se redujo notoriamente (0.005 ± 0.0012) respecto a los discos silvestres (0.009 ± 0.0023) (Figura R21 A, C y D). Una característica a resaltar de los discos mutantes para *hep^{r75}* es que no presentan alteraciones significativas en el número de glías que incorporan EdU (Figuras R21 E, F y G), tampoco se observaron cambios en el índice proliferativo (Figura R21 H) o en el desplazamiento glial (Figura R21 I). Esto sugiere que la reducción del número de glías no se debe a que la proliferación glial haya sido alterada.

En resumen, nuestros datos sugieren que algunos miembros de la ruta JNK (*Bsk* y *Hep*) son requeridos para la correcta migración de la glía durante el desarrollo normal y durante la RRG, pero su función no es requerida para el control de la proliferación. Durante la RRG la función de esta ruta es necesaria tanto en la región dañada como en las células gliales.

Figura R21. Los discos mutantes para *hep^{r75}* presentan reducción del número de glías. (A-C, E y F) Discos de larvas mutantes *egr¹/egr³* (B) y *hep^{r75}/hep^{r75}* (C), y genotipo control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* (A) teñidos con los marcadores Elav en azul y Repo en amarillo en A-C y azul claro en E y F. La señal de incorporación de Edu se detecta en rojo (E y F). **(A-C)** Los discos mutantes *hep^{r75}* (C) presentaron una reducción significativa en su número de glías respecto a los discos control (A) y los discos mutantes para *egr¹/egr³* (B). **(D, G-I)** Gráficos que muestran la densidad de células gliales (D), el porcentaje de glías que incorporan EdU (G), el índice mitótico (H) y el desplazamiento glial (I) de discos con los genotipos anteriores. En todos los casos se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples con excepción de (G) a la que se aplicó el test de Mann-Whitney. **(D)** Medición del índice glial de los genotipos antes mencionados. Se compararon los tratamientos: "Control" > "*hep^{r75}*" y "*hep^{r75}*" < "*egr¹/egr³*" ***= $P < 0.0001$ (n=47, n=32 y n=17, respectivamente). **(G)** Porcentaje de glías que incorporan EdU medido en número de células gliales con EdU / total de células gliales en el disco de ojo. No se encontraron diferencias entre "Control" y "*hep^{r75}*", $P = 0.4832$ (n=10 y n=9, respectivamente). **(F)** Tasa de proliferación glial en la que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, $P = 0.4535$ y $P = 0.0802$ (Control n=24, *hep^{r75}* n=12 y *egr¹/egr³* n=11). **(F)** Medición de la distancia omatidial que recorre la glía. Se compararon "Control" = "*hep^{r75}*" y "Control" > "*egr¹/egr³*", $P = 0.0727$ y **= $P = 0.0093$ (Control n=27, *hep^{r75}* n=20 y *egr¹/egr³* n=17). Las barras de error representan IC 95%

RESULTADOS.



2.2.5. La sobreexpresión de la quinasa Hemipterous en el disco de ojo induce muerte celular.

Debido a que la inhibición de la vía JNK provoca una disminución en el número de células gliales, se decidió analizar si la sobreactivación de esta ruta en el ojo y en la glía podría provocar un aumento en el índice glial. En primer lugar usamos la línea *GMR-Gal4* para dirigir la expresión de *UAS-hep^{CA}* en la región posterior del disco de ojo (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-hep^{CA}/+*). Cuando se sobreexpresó *UAS-hep^{CA}* en el ojo durante 4 días a 29°C (Figura R22 B), el número de glías se incrementó respecto a su control (Figuras R22 A y F). Debido a que la sobreexpresión de *UAS-hep^{CA}* es suficiente para inducir muerte (ver Figuras R1 D-D'), es posible que los efectos en el índice glial sean una consecuencia indirecta de esta muerte. Para analizar esta posibilidad se inhibió la muerte celular asociada a la sobreexpresión de *UAS-hep^{CA}* en el ojo. Para ello, se expresó *UAS-hep^{CA}* conjuntamente con un miRNAs que

simultáneamente inhibe la función de los genes pro-apoptóticos *reaper*, *hid*, y *grim* (micro RGH) (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-hep^{CA}/microRGH*) (Siegrist *et al.*, 2010). También sobreexpresamos *UAS-hep^{CA}* en un fondo mutante para la caspasa iniciadora Dronc (*Dronc¹*) (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}; UAS-hep^{CA} dronc¹/dronc¹*). Al bloquear la muerte con el micro RGH encontramos que los efectos causados por la sobreexpresión de *UAS-hep^{CA}* son totalmente suprimidos (Figuras R22 C y F). No obstante, cuando se expresó *UAS-hep^{CA}* en discos mutantes para *dronc¹* el fenotipo no se suprimió totalmente, ya que se encontraron más células gliales que en discos silvestres (Figuras R22 A, D y F). Una posible explicación para este efecto podría ser que la condición hipomórfica del alelo *dronc¹* que se ha utilizado no es lo suficientemente fuerte como para que la muerte sea suprimida en su totalidad.

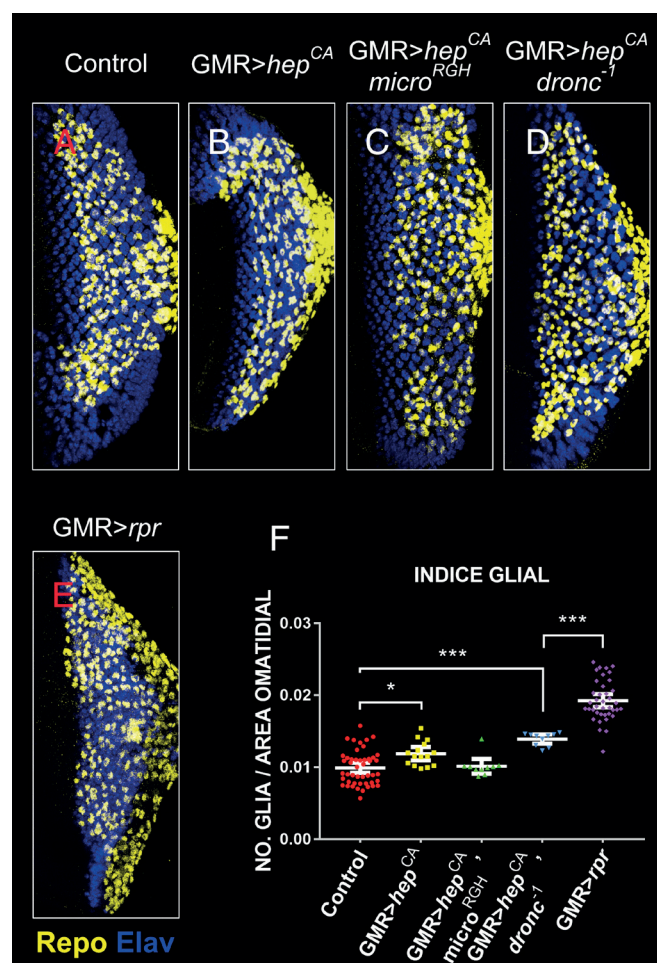


Figura R22. La sobre-expresión de *hep^{CA}* en el disco de ojo no reproduce los efectos causados cuando *reaper* es sobre-expresado .(A-E) Los discos control (A), *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-hep^{CA}/+* (B), *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-hep^{CA}/micro^{RGH}* (C), *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}; UAS-hep^{CA}, dronc¹/dronc¹* (D) y discos dañados *UAS-rpr/+GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*(E) . Los discos fueron teñidos con los marcadores Elav en azul y Repo en amarillo. La sobreexpresión de *UAS-hep^{CA}* en discos de ojo (B) provocó un aumento en el número de glías respecto a su control (A) que fue suprimido al bloquear la apoptosis (C). **(F)** Medición del índice glial en la que se aplicaron las pruebas Anova de una vía y de Tukey y se compararon los tratamientos: “Control” < “*GMR>hep^{CA}*”, “Control” = “*GMR>hep^{CA}micro^{RGH}*”, “Control” < “*GMR>hep^{CA}dronc¹*” y “*GMR>hep^{CA}*” < “*GMR>rpr*”, *=*P*=0.0387 y ***=*P*<0.0001 (Control *n*=47, *GMR>hep^{CA}* *n*=15, *GMR>hep^{CA}micro^{RGH}* *n*=10, *GMR>hep^{CA}dronc¹* *n*=10 y *GMR>rpr* *n*=39, respectivamente). Las barras de error representan IC 95%

RESULTADOS.

Los resultados anteriores muestran que la expresión de *UAS-hep^{CA}* en el disco de ojo promueve el incremento del índice glial debido a que induce muerte celular. Esto sugiere que la activación de la ruta JNK no es suficiente para inducir un incremento de la migración glial por sí misma. Si bien la sobreactivación de la ruta JNK en el disco de ojo no se necesita para incrementar el número de células gliales en este tejido, los resultados anteriores mostraron que ésta ruta se activa en las células gliales como consecuencia del daño. Además, como ya se explicó, la inhibición de esta ruta en la glía reduce su número en el disco de ojo significativamente, por lo que se decidió sobreexpresar *UAS-hep^{CA}* bajo el control de *repo-Gal4* (*w⁺; +/tub-Gal80^{TS}; repo-Gal4/UAS-hep^{CA}*) con el protocolo 3-4-0 (ver metodología). La finalidad de este diseño experimental consistió en comprobar si una subida de la actividad de la vía JNK en las células gliales era suficiente para promover los cambios motogénicos necesarios para incrementar su número en el disco de ojo. Bajo estas condiciones experimentales la sobreexpresión de *hep^{CA}* en la glía fue letal, de modo que se ajustó la sobreexpresión de *hep^{CA}* al protocolo de 8 días de desarrollo y 24 horas de inducción. Este tratamiento también resultó ser una condición letal para el organismo. Debido a estos resultados se procedió a modificar el protocolo para sobreexpresar *UAS-hep^{CA}* antes del tercer estadio larvario. Finalmente, se consiguió desarrollar larvas durante 5 días a 17°C que fueron llevadas a la temperatura permisiva de 29°C sólo durante un día (5-1-0). Con este último diseño experimental no se obtuvo ningún cambio tanto en el número de células gliales (Figura R23 A) como en su desplazamiento (Figura R22 B). Lo que sugiere que la activación de la ruta en la glía no es suficiente para incrementar su número en el ojo.

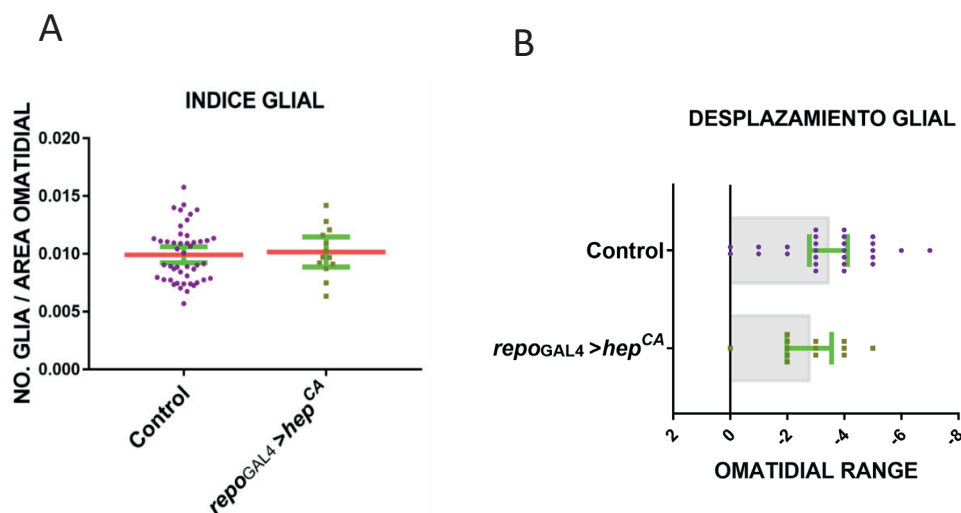


Figura R23. La sobreexpresión de *hep^{CA}* en las células gliales no incrementa la migración glial. (A-B) Medición del índice y desplazamiento glial de discos con el genotipo *tub-Gal80^{TS}/+*; *UAS-hep^{CA}/repo-Gal4* y el genotipo control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* a la que se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar los diferentes tratamientos. No se encontraron diferencias significativas. Índice glial P=0.5701 (n=47 y n=13, respectivamente) y desplazamiento glial P=0.1529 (n=27 y n=13, respectivamente). Las barras de error representan IC 95%

2.3. La vía de señalización de Dpp durante la RRG.

2.3.1. La muerte en el disco promueve la activación no autónoma de la vía de Dpp en las células gliales.

Para entender mejor los mecanismos que regulan la RRG en el disco de ojo, se decidió analizar la función que podrían tener otras rutas de señalización durante este proceso. Los estudios llevados a cabo por Rangarajan *et al.* (2001) sugieren que la vía Dpp está involucrada tanto en el control de la migración glial como en el de la proliferación glial durante el desarrollo larvario. Por ello, se decidió analizar el patrón de expresión de *dpp* durante la inducción de la herida y comprobar si esta vía también es necesaria durante la RRG.

Para analizar el patrón de expresión de esta ruta en el disco de ojo durante el desarrollo y la RRG se utilizaron el reportero *dpp-LacZ*, que evidencia la actividad de este gen, y el anticuerpo para la proteína fosforilada Mad (pMad). Este factor de transcripción se fosforila cuando la ruta de Dpp se activa, de manera que puede utilizarse como reportero de la actividad de esta vía.

Se analizaron discos control de tercer estadio larvario (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*; *dpp-LacZ/+*) en los que se encontró que el reportero *dpp-LacZ* se expresaba en una banda de células en el Surco Morfogenético (SM), imitando la expresión endógena de *dpp* (Flybase) (Figuras R24 A-C'). Además, se examinó la expresión de este reportero en discos que han sido dañados durante 4 días. Mientras que en discos controles la expresión del reportero se limita a una banda de células en la región del Surco Morfogenético, en los discos dañados aparecen parches de expresión ectópica en la región posterior al surco donde se indujo el daño. Las células que aparecen en el borde posterior-apical del disco de ojo, cercana al sitio donde las glías migran (Flechas verdes en figuras R24 D, D', F y F'), y en la región basal, también cercana a las células gliales (Flechas verdes en figuras R24 E y E'). Además, en los discos dañados la expresión de *dpp-LacZ* localizada en el SM se expandió, entrando en contacto con las células gliales que superan el Límite Neurogénico Anterior (Figuras R24 E y F).

RESULTADOS.

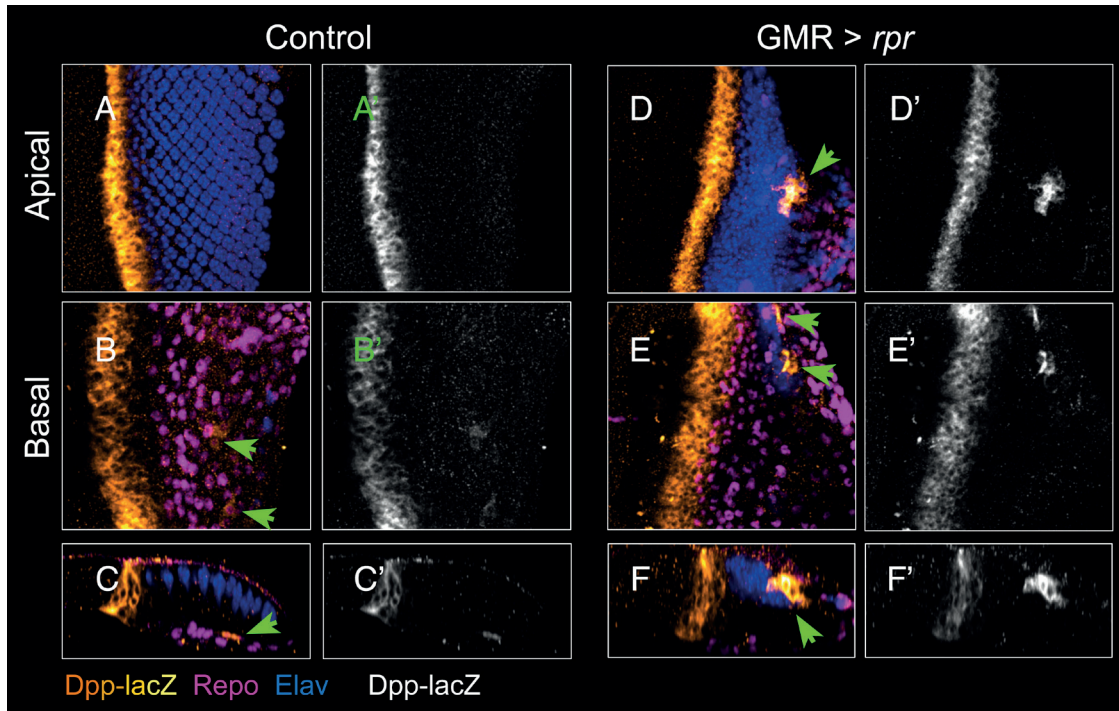


Figura R24. Activación de la vía Dpp durante el desarrollo normal y durante la RRG en el disco de ojo (A-F') Se muestran discos de larvas de genotipos control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; dpp-LacZ/+* (A-C') y de discos dañados *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; dpp-LacZ/+* diseccionados después de 4 días de ablación genética (D-F') que fueron teñidos para el marcador neuronal Elav en azul, el marcador glial Repo en magenta y anti-βGal (anti-βGalactosidasa) para mostrar la expresión de *dpp-LacZ* (gradiente de anaranjado a blanco en A-F y gris en A'-F'). C, C', F y F' son cortes transversales. **(A-C')** La expresión del reportero *dpp-LacZ* se observó cerca de algunas células gliales y en el SM. **(D-F')** En discos con herida la expresión en el SM se expandió y se detectó expresión ectópica en el borde posterior-apical del disco de ojo y en la región basal, cerca de las células gliales (Flechas verdes).

Los resultados obtenidos gracias al análisis de la expresión de pMad confirman el incremento de la actividad de la ruta de Dpp en respuesta al daño, ya que en discos lesionados observamos un aumento en la expresión de pMad en la región posterior al SM y en glías cercanas al SM (Flechas rosas en figuras R25 E-F'). En discos control la expresión de pMad se restringió al SM y a la región anterior del disco (Figuras R25 A-C').

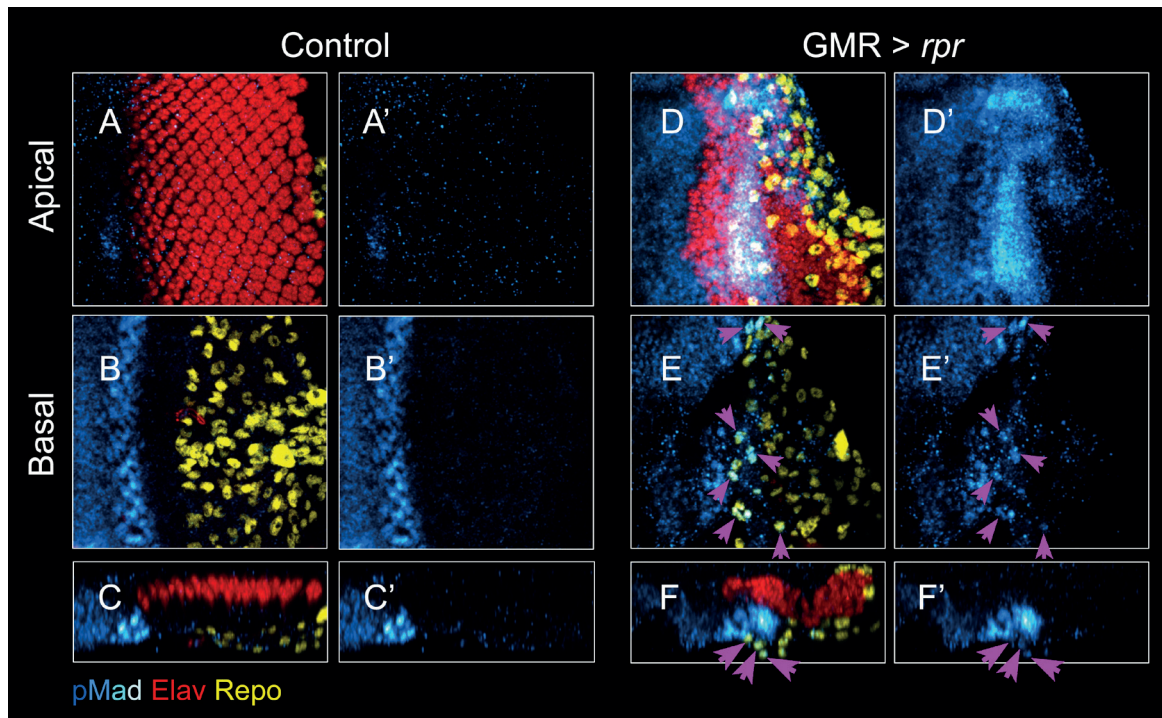


Figura R25. Activación de la vía Dpp en las células gliales de discos control y con herida. (A-F') Se muestran discos de larvas control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* (A-C') y discos dañados *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80TS/+* diseccionados después de 4 días de ablación genética (D-F'). Los discos fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en rojo, el marcador glial Repo en amarillo y anti-pMad en gradiente de azul a blanco. C, C', F y F' son cortes transversales. **(A-C')** La señal del anticuerpo pMad en la región anterior del disco y en el SM de discos control. **(D-F')** En discos con herida la señal del anticuerpo se ubicó en la región de la lesión y en las células gliales circundantes (Flechas magenta).

Estos datos indican que la ablación genética en la región de la retina provoca un incremento en la expresión de *dpp*, esto tiene como consecuencia una activación de la vía Dpp en las células gliales, denotada por el incremento en la expresión de pMad. Esta activación podría indicar que el incremento de la proliferación y migración glial, observado como respuesta al daño, estaría mediado por la ruta de Dpp.

2.3.1.1. Expresión de *dpp* durante la activación o inhibición de la vía de JNK.

Nuestros resultados indican que cuando se produce daño se activan tanto la vía de Dpp como la de JNK. Diferentes estudios han mostrado que la activación de la ruta de la JNK puede inducir la expresión de *dpp* (Pérez-Garijo et al. 2009; Ryoo et al. 2004; Bergantiños et al. 2010). Por lo que es posible que el incremento de *dpp* encontrado tras la lesión sea una consecuencia de la activación de la JNK. Para comprobarlo se analizó la expresión del reportero *dpp-LacZ* en discos con daño en los que se modificó la actividad de la vía JNK.

Para ello, se sobreexpresó *UAS-bsk^{DN}* con la línea *GMR-Gal4* para bloquear la vía de la JNK en dis-

RESULTADOS.

cos de ojo, y se analizó la expresión del reportero *dpp-LacZ* durante el desarrollo normal y tras inducir daño. En primer lugar, analizamos los efectos en la expresión de *dpp-LacZ* cuando se inhibe la ruta de la JNK. Para realizar este experimento se trasladaron larvas *UAS-bsk^{DN}/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/dpp-LacZ* y larvas control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/dpp-LacZ* a 29°C durante 4 días. En los discos donde se sobreexpresó *UAS-bsk^{DN}* la señal del reportero en la región del SM fue similar a la de discos silvestres. Sin embargo, observamos algunas glías en la retina que expresaban de manera ectópica el reportero *LacZ* de *dpp* (flechas en Figuras R26 E' y F'). Esto sugiere que la vía JNK podría regular de manera no autónoma la actividad de Dpp en las células gliales durante el desarrollo normal. A su vez, se analizó la expresión de este reportero en discos dañados donde además se bloqueó la vía de la JNK. Para inducir daño e inhibir la vía de la JNK en el disco de ojo se trataron larvas *UAS-rpr/UAS-bsk^{DN}; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/dpp-LacZ* utilizando el mismo protocolo mencionado anteriormente. La inhibición de la vía JNK en estos discos dañados (Figuras R26 G-I') no dio lugar a cambios significativos comparados con discos que únicamente habían sido dañados (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/dpp-LacZ*) (Figuras R26 G-L').

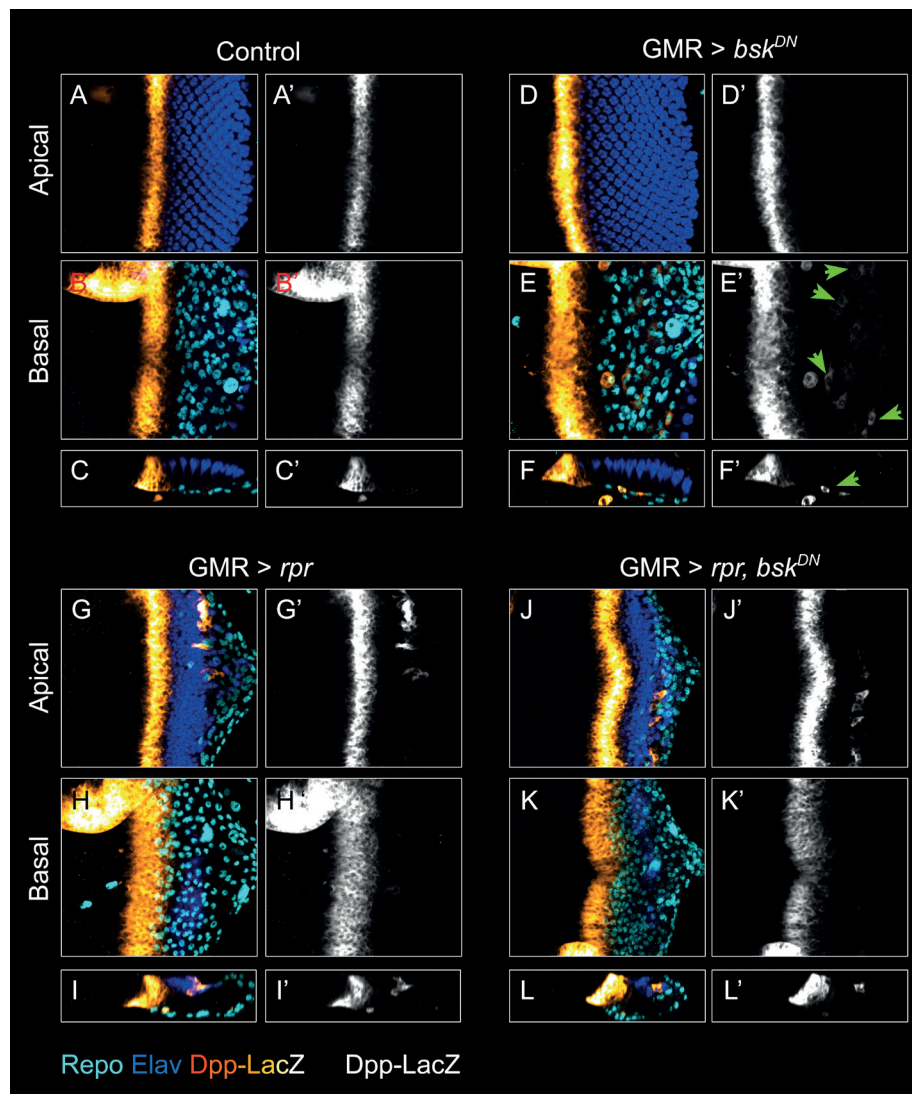
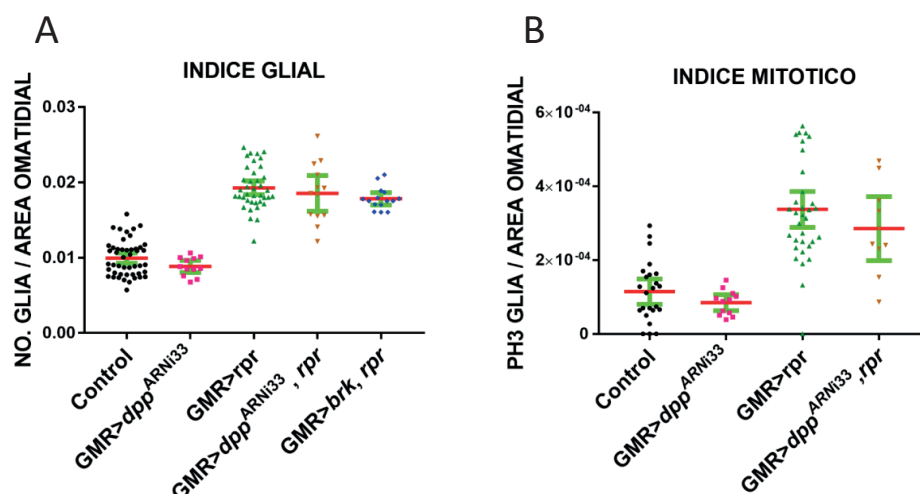


Figura R26. Expresión del reportero *dpp-LacZ* durante la inhibición de la vía de JNK.(A-L') Se muestran discos de larvas control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/dpp-LacZ* (A-C'), *UAS-bsk^{DN};GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/ dpp-LacZ* (D-F'), control *UAS-rpr*; *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/ dpp-LacZ* (G-I') y *UAS-rpr/UAS-bsk^{DN}; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/ dpp-LacZ* (J-L') diseccionados después de 4 días de ablación genética. Los discos fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul, el marcador glial Repo en cian y el reportero *dpp-LacZ* en gradiente de anaranjado a blanco. C, C', F, F', I, I', L y L' son cortes transversales. **(A-C')** La expresión del reportero *dpp-LacZ* en discos control se localiza cerca de algunas células gliales y en el SM. **(D-F')** En discos con bloqueo de la JNK se detecta expresión ectópica en la región basal anterior del disco, cerca de las células gliales. **(G-I')** La expresión del reportero *dpp-LacZ* en discos dañados se expande en la región posterior del disco y aparecen parches de expresión ectópica. **(J-L')** En discos donde se induce daño y bloquea la JNK se detectó expresión ectópica en la región posterior del disco y la expresión del SM se expande hacia la zona anterior, como ocurre en discos que han sido únicamente dañados.

2.3.2. El bloqueo de la actividad de la vía de Dpp en las células gliales altera la RRG.

Estudios precedentes indican la importancia de la vía de Dpp en la migración glial durante el desarrollo del disco de ojo (Rangarajan *et al.*, 2001). Adicionalmente, nuestros datos muestran que cuando la zona retinal del ojo sufre daño se produce una activación ectópica de esta vía en las células gliales. Por lo que es posible que la ruta de Dpp pudiera estar mediando algunos de los procesos que suceden durante la RRG. Para estudiar esta hipótesis en primer lugar, inhibimos la actividad de *dpp* en el disco y analizamos los efectos ocasionados sobre las células gliales tanto en discos control como en discos dañados. Nuestro diseño experimental consistió en sobreexpresar durante 4 días un ARN de interferencia que reduce la cantidad de ARN mensajero de *dpp* bajo el control de *GMR-Gal4* en discos que no fueron dañados (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-dpp^{ARNi33618}/+*) y en discos dañados (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-dpp^{ARNi33618}/+*). Como se observa en la gráfica de la figura R27, la reducción de *dpp* en el disco de ojo durante el desarrollo larvario o en discos con herida no produce ningún efecto en la densidad de glías, ni tampoco en el índice mitótico glial.



RESULTADOS.

Figura R27. La sobreexpresión de ARN de interferencia para *dpp* en el disco no altera la migración y proliferación glial. (A-B) Densidad glial e índice mitótico glial de discos control (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS GFP*), discos en los que se bloquea *dpp* *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-dpp^{ARNi33618}/+* (*GMR>dpp^{ARNi33}*); discos dañados *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* (*GMR>rpr*); discos dañados en los que se bloquea *dpp* *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*; *UAS-dpp^{ARNi33618}/+* (*GMR>dpp^{ARNi33} rpr*), y discos dañados en los que sobreexpresó *brk* *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*; *UAS-brk/+* (*GMR>brk rpr*). **(A)** En el análisis estadístico se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar “Control” = “*GMR>dpp^{ARNi33618}*”, sin encontrar diferencias significativas en el índice glial $P=0.1408$ ($n=47$ y $n=12$ respectivamente) y las pruebas de Anova y Tukey para comparar el índice glial entre “*GMR>rpr*” = “*GMR>rpr, UAS-dpp^{ARNi33618}*” y “*GMR>rpr*” = “*GMR>rpr, brk*”. $P=0.6744$ (*GMR>rpr* $n=39$, *GMR>rpr, UAS-dpp^{ARNi33618}* $n=13$ y *GMR>rpr, brk* $n=15$) **(B)** Para el análisis del índice mitótico se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar “Control” = “*GMR>dpp^{ARNi33618}*” y “*GMR>rpr*” = “*GMR>rpr, UAS-dpp^{ARNi33618}*” sin encontrar diferencias significativas entre los tratamientos $P=0.2208$ (Control $n=24$, *GMR>rpr* $n=34$, *GMR>UAS-dpp^{ARNi33618}* $n=12$ y *GMR>rpr dpp^{ARNi33618}* $n=11$). Las barras de error representan IC 95%

Cuando se bloqueó la actividad de esta ruta en discos dañados sobreexpresando al represor transcripcional de la vía Brinker (Brk) y al gen proapoptótico *rpr*, se obtuvieron resultados similares (Figura R27 A). Esto indica que la reducción de la actividad de la ruta de Dpp en la región dañada, no es suficiente para alterar la respuesta regenerativa glial.

Con el fin de analizar si la vía de Dpp es requerida en las células gliales durante la RRG, se inhibió la vía únicamente en las células gliales y se indujo daño. Para ello se sobreexpresó el represor Brk con la línea *repo-Gal4* y se indujo daño con el sistema *QF/QUAS*. Con este fin, se trasladaron larvas *GMR-QF/+; tub-Gal80^{TS}/+*; *repo-Gal4 QUAS-rpr/UAS-brk* a 29°C durante 4 días después de 3 días de desarrollo a 17°C. Con estas condiciones experimentales se encontró que la sobreexpresión de *brk* en las células gliales elimina todos los efectos observados en discos control que sufrieron daño (*GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+*; *repo-Gal4/QUAS-rpr*). Observamos que se suprime el incremento del número de glías (Figuras R28 D y E), el aumento de la proliferación glial (Figuras R28 D y F) y los defectos en el desplazamiento glial hacia el LNA (dicho límite está señalado por las líneas punteadas en cada una de las Figuras R29 A-D, la distancia entre el límite y las glías está cuantificada en la Figura R28 G). Por otra parte, encontramos que la sobreexpresión de *brk* con *repo-Gal4* utilizando las mismas condiciones experimentales, fue suficiente para reducir el número de células gliales (Figuras R28 B y E), el índice mitótico glial (Figuras R28 B y F), así como para retrasar el desplazamiento de las glías (Figura R28 G) respecto de discos de ojo control que no han sido dañados (Figura R28 A).

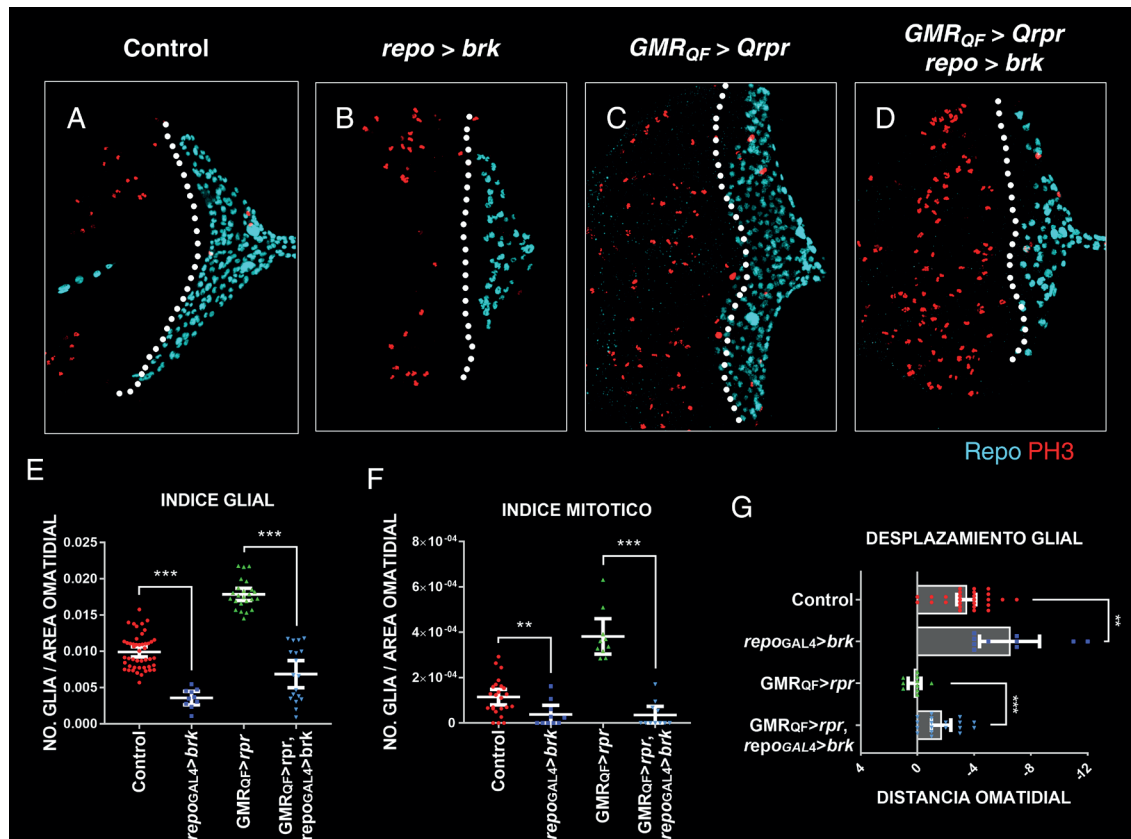


Figura R28. La sobreexpresión del represor Brk en las células gliales reduce la proliferación y migración celular en discos control y en discos dañados (A-D) Discos teñidos con los marcadores PH3 en rojo y Repo en cyan. La línea *repo-Gal4* dirige la expresión del represor *brk* en las células gliales en (B) y en (D). La línea *GMR-QF* se utilizó para inducir la ablación inducida por *rpr* en la zona neurogénica del ojo en (C) y (D). La línea punteada en los discos marca el LNA. **(E-G)** Representaciones gráficas que muestra la densidad de células gliales (E), el índice proliferativo (F) y el desplazamiento glial (G) de discos controles *GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4/+*; discos *tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4 UAS-brk* (*repo>brk*); discos *GMR-QF/+; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4 QUAS-rpr/+* (*GMR_{QF}>rpr*), y discos *GMR-QF; tub-Gal80^{TS}/+; repo-Gal4 QUAS-rpr/UAS-brk* (*GMR_{QF}>rpr, repo-Gal4>brk*) sometidos al protocolo 3-4-0. **(E)** Gráfico donde se representa el índice glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: “control” > “*repo-Gal4>brk*”, “*GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>brk*” < “*GMR_{QF}>rpr*” con un nivel de significancia de ***= $P < 0.0001$ (control $n=47$, *repo-Gal4>brk* $n=10$, *GMR_{QF}>rpr* $n=24$ y *GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>brk* $n=18$). **(F)** Estimación de la proliferación glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: “control” > “*repo-Gal4>brk*”, “*GMR_{QF}>rpr, repo-Gal4>brk*” < “*GMR_{QF}>rpr*” con un nivel de significancia de **= $P < 0.0053$ ***= $P < 0.0001$ ($n=24$, $n=10$, $n=10$ y $n=11$ respectivamente). **(G)** Medición del desplazamiento glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar los tratamientos: “control” > “*repo-Gal4>brk*”, “*GMR_{QF}>rpr repo-Gal4>brk*” < “*GMR_{QF}>rpr*” con un nivel de significancia de **= $P < 0.0081$ ***= $P < 0.0001$ (control $n=24$, *repo-Gal4>brk* $n=10$, *GMR_{QF}>rpr* $n=10$ y *GMR_{QF}>rpr, repo-Gal4>brk* $n=18$ respectivamente). Las barras de error representan IC 95%.

Estos datos indican que la activación de la vía de Dpp es necesaria en las células gliales para incrementar tanto la proliferación como la migración de estas células en respuesta al daño en la retina.

2.3.3. La sobreexpresión de Dpp en el disco de ojo incrementa el número de células gliales retinales.

Los resultados anteriores demuestran que, al dañar la retina, la ruta de Dpp se activa en esta

RESULTADOS.

región y en las células gliales. Además, encontramos que el incremento migratorio y proliferativo glial durante la RRG puede suprimirse al reprimir la ruta en las células gliales.

Para averiguar más sobre el papel que juega la vía de Dpp durante la RRG se analizó si la sobreexpresión de *UAS-dpp* bajo el control de *GMR-Gal4* era suficiente para reproducir algunos de los efectos ocasionados por la ablación genética. Por lo que se trasladaron larvas *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-dpp/+*, durante 4 días a 29°C y se compararon con discos control (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP*) (Figura R29 A) y discos donde se indujo ablación genética (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4tub-Gal80^{TS}/+*) (Figura R29 C) sometidos al mismo tratamiento.

En primer lugar, observamos que la sobreexpresión de *dpp* usando nuestro diseño experimental provocó un aumento en la densidad células gliales en el disco de ojo con respecto a las encontradas en discos control (Figuras R29 A, B y E). Este aumento no parece deberse únicamente a un incremento de la proliferación ya que, a pesar de que el índice mitótico parece ligeramente elevado, nuestro análisis estadístico indica que no hay diferencias significativas con respecto al índice mitótico de los discos control (Figura R29 F). Sin embargo, se observó un aumento en el desplazamiento de las células gliales de discos en los que se sobreexpresó *dpp* (Figura R29 B y G), fenómeno similar a lo observado por (Yuva-Aydemir *et al.*, 2011 y Rangarajan *et al.* 2001).

Otro resultado obtenido fue que los efectos en el desplazamiento y la proliferación glial producidos por la sobreexpresión de *UAS-dpp* fueron inferiores a los causados por la inducción de muerte (Figuras R29 B, C, E-F). Esto indica que Dpp no es suficiente por sí solo para provocar los efectos motogénicos que desencadena la RRG en el disco de ojo, por lo tanto, deben de existir otros mecanismos que se activen al mismo tiempo que Dpp para promover la RRG.

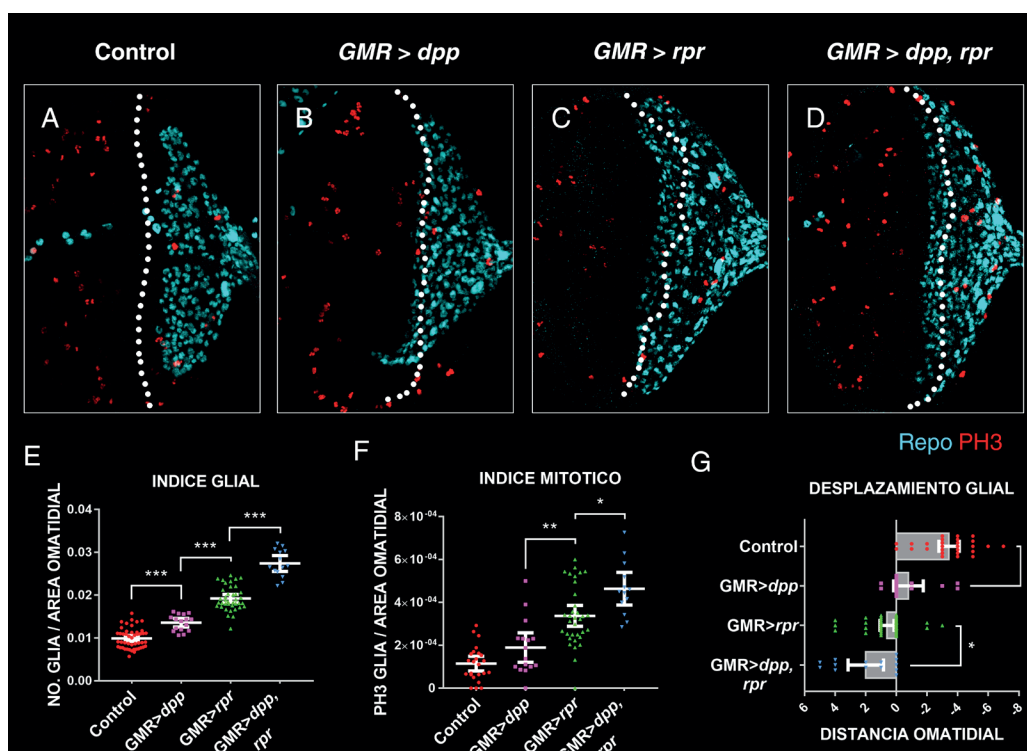


Figura R29. La sobreexpresión de *dpp* en el disco de ojo aumenta el número de células gliales retinales (A-D) Discos de larvas controles *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP*, discos en los que se sobreexpresó *dpp* *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+;UAS-dpp/+* (*GMR>dpp*), discos con herida *UAS-rpr GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* (*GMR>rpr*) y discos dañados en los que sobreexpresamos *dpp* *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-dpp/+* (*GMR>dpp, rpr*). Los discos fueron teñidos con los marcadores PH3 en rojo y Repo en cyan. La línea punteada en los discos marca el LNA. **(E-G)** Representaciones gráficas que muestran la densidad glial (E), el índice proliferativo (F) y el desplazamiento glial (G) de discos con los genotipos anteriores sometidos al protocolo 3-4-0. **(B)** Gráfico donde se representa el índice glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: “control” > “*GMR>dpp*”, “*GMR>dpp*” < “*GMR>rpr*” y “*GMR>rpr*” > “*GMR>dpp, rpr*” con un nivel de significancia de ***= $P < 0.0001$ (control $n=47$, *GMR>dpp* $n=16$, *GMR>rpr* $n=39$ y *GMR>dpp, rpr* $n=14$ respectivamente). **(C)** Estimación de la proliferación glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: “*GMR>dpp*” < “*GMR>rpr*” y “*GMR>rpr*” > “*GMR>dpp, rpr*” con un nivel de significancia de *= $P < 0.0106$ **= $P < 0.0008$ (control $n=24$, *GMR>dpp* $n=16$, *GMR>rpr* $n=34$ y *GMR>dpp, rpr* $n=13$ respectivamente). **(D)** Medición del desplazamiento glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar los tratamientos: “control” > “*GMR>dpp*” y “*GMR>rpr*” > “*GMR>dpp, rpr*” con un nivel de significancia de **= $P < 0.0385$ ***= $P < 0.0001$ (control $n=27$, *GMR>dpp* $n=14$, *GMR>rpr* $n=39$ y *GMR>dpp, rpr* $n=14$). Las barras de error representan IC 95%.

Por último, se exploró la posibilidad de que la ablación genética y la sobreexpresión de *dpp* pudieran ejercer un efecto sinérgico. Para ello, se sobreexpresaron tanto *UAS-dpp* como *UAS-rpr* con la línea *GMR-Gal4* durante 4 días (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-dpp/+*). Esta expresión simultánea provocó un aumento en el número de glías, el índice mitótico y el desplazamiento ectópico glial (Figura R29 D) superior al encontrado tanto en discos donde solamente se indujo muerte (Figura R29 C) como en discos donde únicamente se sobreexpresó *dpp* (Figuras R29 B, E-G). Este sinergismo podría deberse a que la muerte induce señales que actúan junto con la ruta de Dpp para promover la RRG.

2.4. La actividad de la ruta de Hh durante la RRG.

2.4.1. La vía de Hh se activa en el disco de ojo durante la RRG.

Existen evidencias de que la vía de Hedgehog (Hh) está implicada en el control de la migración de las células gliales retinales durante el desarrollo larvario (Hummel *et al.*, 2002 y Rangarajan *et al.*, 2001). Por lo tanto, se decidió explorar si esta ruta podría estar mediando la RRG. Para ello, en primer lugar, se analizó el patrón de expresión de la ruta Hh en discos de ojo que habían sido dañados. Con este fin se utilizó una línea en la que el gen de la β Galactosidasa está bajo el control de la región reguladora de *hh* (*hh-LacZ*). Además, se completó este análisis estudiando la expresión de Patched (Ptc), que se ha descrito como un gen diana de la ruta, de manera que su expresión puede ser utilizada como un indicativo de la actividad de la ruta de Hh.

En discos de ojo control de tercer estadio larvario (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; hh-LacZ/+*) la señal del reportero *hh-LacZ* fue detectada únicamente en las células fotorreceptoras y accesorias (Figuras R30 A, A', C y C'). No se observó señal de *hh-LacZ* en las células gliales. Cuando examinamos la expresión de este reportero en discos que fueron dañados (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; hh-LacZ/+*), observamos que la señal fue más intensa en las células fotorreceptoras que se encuentran cercanas a la

RESULTADOS.

herida (Figuras R30 A, A', C y C'). En esta región es donde con frecuencia encontramos algunas células gliales que han migrado ectópicamente a la región apical del disco (Figuras R30 D, D', F y F'). Los resultados obtenidos con el análisis de la expresión de Patched usando un anticuerpo contra esta proteína confirman el incremento de la actividad de la ruta de Hh. De modo que, mientras que en discos controles (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*) Ptc se expresa a altos niveles en la región del SM (Figuras R30 G-I'), en discos dañados (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*) Ptc se expresa a altos niveles en la mayoría de las células que conforman la retina y en muchas células gliales. En estas células se observó que los niveles más altos se localizaron en las glías que migran a zonas apicales y mediales de los discos (flechas amarillas en Figuras R30 K y K').

El hecho de que algunas de las células gliales que expresan Ptc a altos niveles se encuentren cerca de la región donde se expresa el reportero *hh-LacZ* sugiere que las células en la región dañada secretan Hh de forma paracrina para activar la ruta en las células gliales

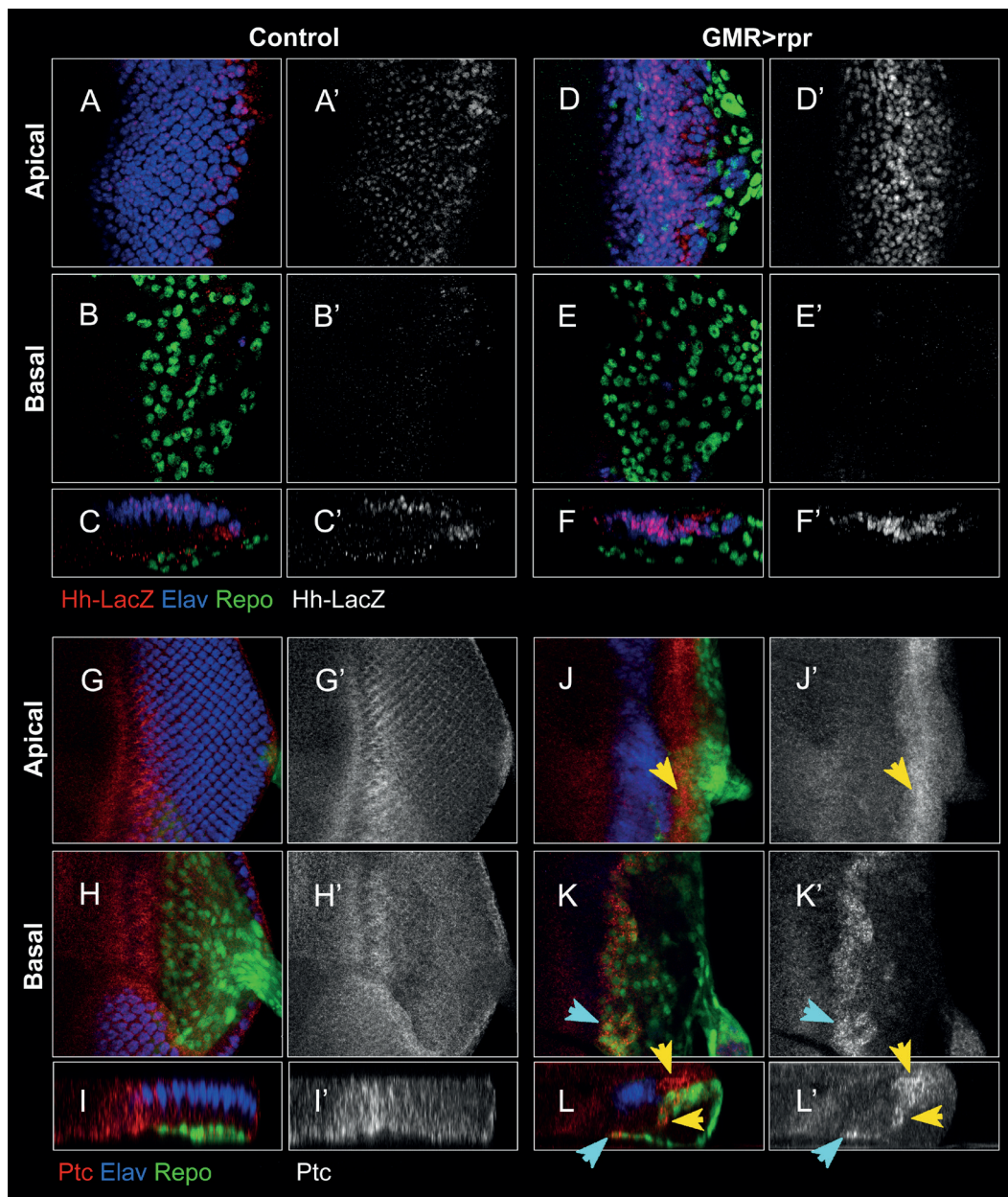


Figura R30. La vía Hh se activa en respuesta al daño en discos de ojo (A-F') Discos de larvas control sin dañar *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; hh-LacZ/+* (A-C') y discos dañados *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; hh-LacZ/+* Los discos fueron diseccionados inmediatamente después de ablación genética (D-F') y teñidos con el marcador neuronal Elav en azul, el marcador glial Repo en verde y anti-βGal (anti-βGalactosidasa) para mostrar la expresión de *hh-LacZ* rojo en A-F y gris en A'-F'. C, C', F y F' son cortes transversales. **(A-C')** La expresión del reportero *hh-LacZ* se observó únicamente en las células fotorreceptoras y accesorias del disco. **(D-F')** En discos con herida la señal *hh-LacZ* se detectó más intensa en las células fotorreceptoras y accesorias circundantes a la herida. **(G-L')** Se muestran discos de larvas control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP* (G-I') y discos dañados *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* diseccionados después de 4 días de ablación genética (J-L') que fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul, el marcador glial Repo en verde y anti-Ptc en rojo en G'-I' y gris en J'-L'. C, C', F, F', I, I', L Y L' son cortes transversales. **(G-I')** La señal de Ptc en discos control se expresa a altos niveles en la región del SM. **(J-L')** En discos dañados Ptc se encontró a altos niveles en muchas de las células que conforman la retina y en las células gliales (Flechas amarillas).

2.4.1.1. Patrón de expresión del ligando Hh durante la inhibición de la JNK.

Tomando en cuenta que tras la inducción de apoptosis se activa la vía de Hh en la región dañada del ojo y en las células gliales, y que la vía de la JNK es importante para promover los efectos de la RRG en este epitelio, decidimos profundizar más sobre el tipo de relaciones funcionales que existen entre las distintas señales activadas en respuesta al daño de la retina. Hemos analizado si la activación de la ruta de Hh podría ser consecuencia del incremento de la actividad de la vía JNK. Para ello, examinamos la expresión del reportero *hh-LacZ* en discos dañados a los que se les bloqueó la vía de la JNK al co-expresar *UAS-bsk^{DN}* y *UAS-rpr* con la línea *GMR-Gal4*.

En discos en los que sólo bloqueamos la actividad de la JNK (*UAS-bsk^{DN}/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; hh-LacZ/+*), durante 4 días a 29°C, observamos que la señal del reportero *hh-LacZ* (Figuras R31 C-C') se redujo débilmente en comparación de los discos control (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; hh-LacZ/+*) sometidos al mismo protocolo (Figuras R31 A-B'). Sin embargo, cuando se indujo daño en los discos a la vez que se inhibía la ruta de la JNK (*UAS-bsk^{DN}/UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; hh-LacZ/+*), la señal del reportero fue similar a la de los discos control donde sólo se indujo daño (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; hh-LacZ/+*) (Figuras R31 E-H'). Estos resultados indican que la activación de *hh* en discos dañados no se debe al incremento de la ruta de la JNK.

RESULTADOS.

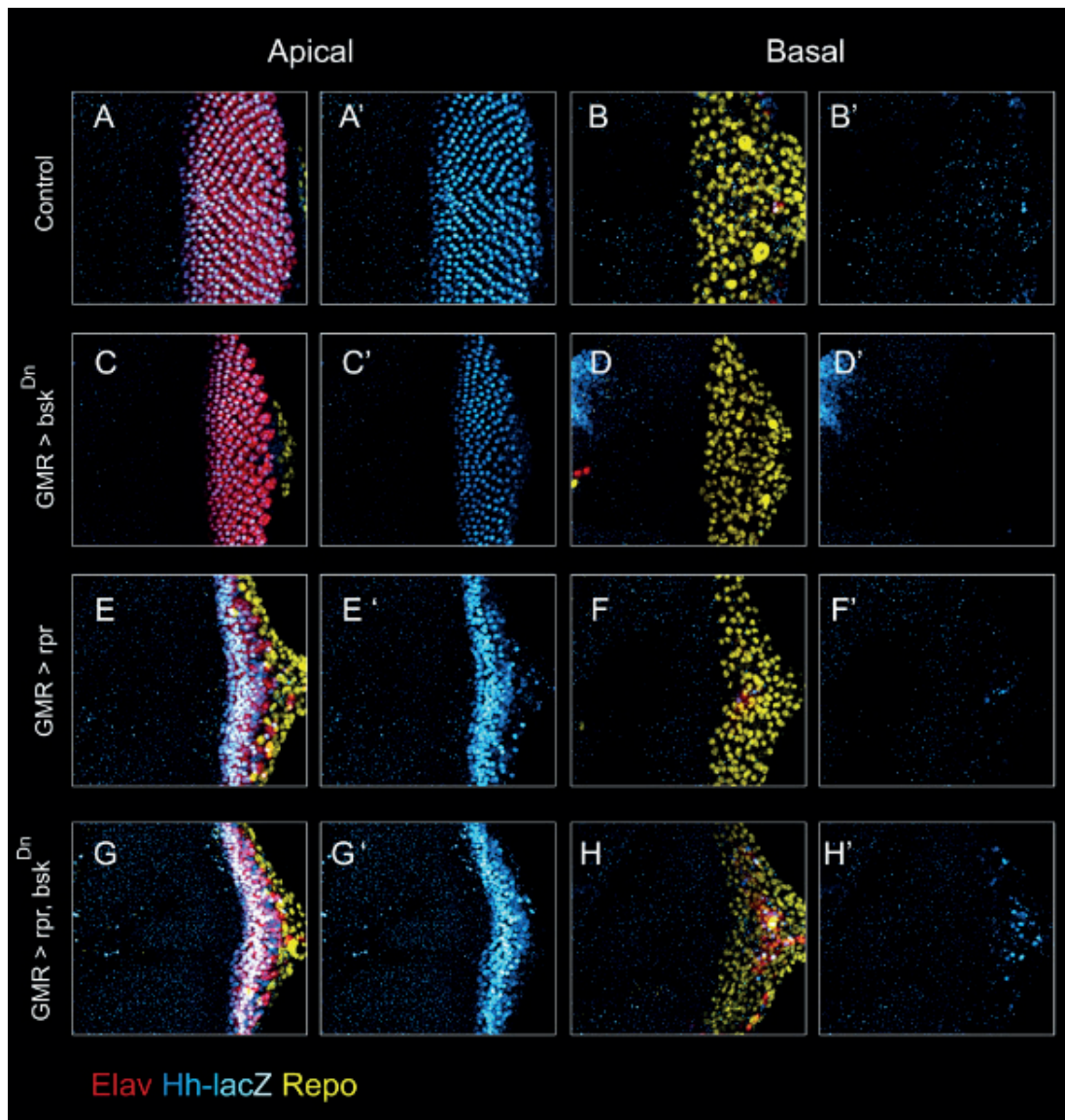


Figura R31. Expresión del reportero *hh-LacZ* tras la inhibición de la vía de JNK en discos dañados. (A-H') Se muestran discos de larvas control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/hh-LacZ* (A-B'), *UAS-bsk^{DN};GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/hh-LacZ* (C-D'), discos dañados control *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/hh-LacZ* (E-F') y discos dañados en los que se ha bloqueado la JNK *UAS-rpr/UAS-bsk^{DN};GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/hh-LacZ* (G-H'). Los discos fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en rojo, el marcador glial Repo en amarillo y anti-βGalactosidasa para revelar la actividad del reportero *hh-LacZ* en gradiente de azul a blanco. **(A-B')** La expresión del reportero *hh-LacZ* se intensifica en la zona de la herida en algunas de las células que componen el disco. **(G-H')** En discos donde se induce daño y bloquea la JNK se detectó una señal similar a la de los discos control dañados.

2.4.2. Disminución de la actividad de la ruta de Hh en el disco de ojo.

Nuestros datos señalan que la ruta de Hh se activa cuando se produce daño en la región de la retina, esto da lugar a un incremento de la actividad de esta ruta en las células gliales. Para definir si esta actividad puede estar mediando la RRG, hemos eliminado la función de *hh* en discos de ojo dañados. Para ello, hemos bloqueado la función de *hh* al sobreexpresar un ARN de interferencia para este gen en la región dañada. Encontramos que tanto el índice glial como el índice mitótico en discos *UAS-rpr/+*;

GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-hh^{ARNi}/+, sometidos a un tratamiento de 4 días a 29°C, es similar al observado en discos controles (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*) (Figuras R32 A Y B).

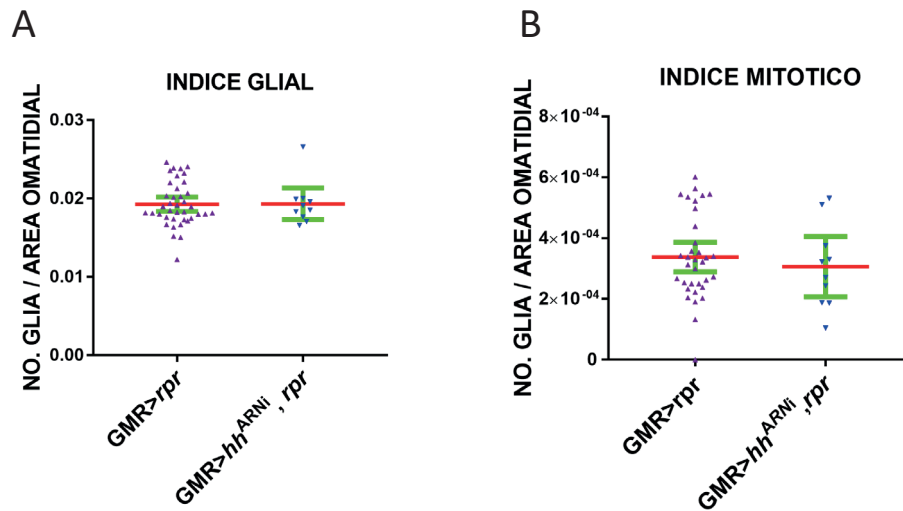


Figura R32. La sobreexpresión de ARN de interferencia para *hh* en el disco no altera la migración y proliferación glial. (A-B) Las gráficas representan la densidad e índice mitótico glial de discos *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-hh^{ARNi}/+* (*GMR>hh^{ARNi} rpr*) y discos controles dañados *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* (*GMR>rpr*). En el análisis estadístico se aplicó la prueba de Mann-Whitney para comparar “Control” = “*GMR> hh^{ARNi}”*, sin encontrar diferencias significativas en el índice glial y mitótico $P=0.1408$ ($n=39$ y $n=10$) para el índice glial y $P=0.4118$ ($n=34$, $n=10$) para el índice mitótico. Las barras de error representan IC 95%

2.4.3. Efectos causados por la sobreexpresión de *hh* en el disco de ojo y en las células gliales.

Como complemento al análisis de falta de función de *hh*, hemos estudiado los efectos producidos al sobreexpresar este gen en la región de la retina. Los discos de larvas de tercer estadio larvario en los que *UAS-hh* fue sobreexpresado durante 4 días (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-hh-GFP*) no presentaron ningún cambio en el número de glías, el índice mitótico glial o en el desplazamiento glial (Figura R33 A, B y C).

Hemos analizado si la sobreexpresión de *hh* podría incrementar los efectos causados al dañar la región de la retina, como observamos al sobreexpresar *dpp*. Para ello, transferimos larvas *UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-hh-GFP* a 29°C durante 4 días. En estos discos no se apreciaron cambios significativos ni en el índice mitótico y ni en el desplazamiento glial, sólo se detectó que el índice glial en estos discos era ligeramente menor a los discos con herida (Figura R33). Esta disminución en el índice glial podría deberse a que la sobreexpresión de *hh* en el disco de ojo provoca sobrecrecimiento retinal (Christiansen *et al.*, 2012), esto ocasiona que la relación entre área retinal y número de glías se altere dando un índice glial más bajo. Además de esto, se ha descrito que durante las primeras etapas del desarrollo del disco la función de *hh* es la de impedir la entrada de células gliales (Hummel *et al.*, 2002). Por lo tanto, la sobreexpresión de *hh* a inicios del segundo estadio larvario, según el diseño experimen-

RESULTADOS.

tal utilizado, estaría evitando que entren al disco un exceso de células gliales como consecuencia del daño.

También hemos analizado si la sobreexpresión de *hh* en las células gliales (*tub-Gal80^{TS}/UAS-hh-GFP; UAS-repo/+*) afectaba al desarrollo de estas células. Encontramos que la sobre-expresión de *hh* en las glia no afecta ni a la densidad ni a la proliferación de las células gliales (Figura R33 A). Únicamente observamos que el desplazamiento glial estaba alterado, ya que las células gliales no avanzaron hacia la posición anterior de manera regular como en los discos control (Figura R33 C).

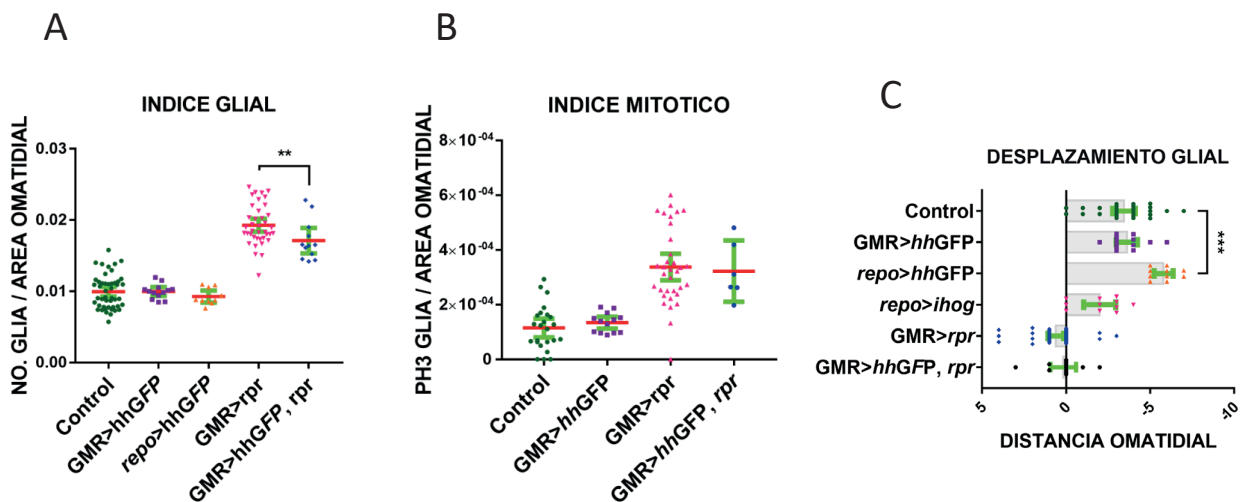


Figura R33. Sobreexpresión de *hh* en discos de ojo. (A-C) Densidad glial (A), índice mitótico (A) y desplazamiento glial (C) en discos control, discos *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-hhGFP/+* (*GMR>hhGFP*), *tub-Gal80^{TS}/+; UAS-hhGFP/repo-Gal4* (*repo>hhGFP*), *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+(GMR>rpr)*, y *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-hhGFP/+* (*GMR>hhGFP, rpr*) Para el análisis estadístico se aplicó la prueba de Mann-Whitney con excepción de las comparaciones entre *GMR>hhGFP*, *repo>hhGFP* y Control a las que se aplicaron pruebas de Anova y Tukey para comparaciones múltiples. Sólo se encontraron diferencias significativas entre “*GMR>rpr*” < “*GMR>rpr, hhGFP*” en el índice glial $P=0.0073$ ($n=39$ y $n=12$) y entre “Control” < “*repo>hhGFP*” en el desplazamiento glial $P=0.0017$ ($n=39$, $n=13$). Las barras de error representan IC 95%

2.5. Interacción entre las rutas de Dpp y Hh durante la RRG.

2.5.1. La inhibición simultánea de Dpp y Hh en el disco de ojo reduce la RRG.

Trabajos previos sobre el desarrollo del disco de ojo han demostrado que la interacción entre las rutas de Dpp y Hh es fundamental para la formación del ojo y el lóbulo óptico (Silies *et al.*, 2010, Curtiss and Mlodzik, 2000; Domínguez, 1999; Huang *et al.*, 1998; Domínguez y Hafen, 1997). Algunos de estos trabajos han demostrado que durante la progresión del surco morfogénico ambas rutas de señalización funcionan de forma redundante, de manera que únicamente cuando ambas rutas son elimi-

nadas se impide la progresión de este. Del mismo modo, los estudios llevados a cabo por Rangarajan *et al.*, (2001) sugieren que dicha interacción es importante durante la migración glial hacia el disco de ojo. Debido a estos antecedentes se decidió analizar si al eliminar ambas rutas de manera simultánea se suprimían algunos de los procesos que hemos observado que ocurren durante la RRG. Con este fin co-expresamos *UAS-hh^{ARNi}* y *UAS-dpp^{ARNi}* bajo la regulación de *GMR-Gal4* en discos con daño y en discos donde no se indujo apoptosis.

Tras 4 días de inducción a 29°C los discos de ojo de larvas en los que inducimos daño y bloqueamos las rutas de Dpp y Hh (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-dpp^{ARNi}; UAS-hh^{ARNi}/+*) presentaron una disminución en la densidad de células gliales con respecto a su control (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*) (Figura R34). En los discos en los que se redujo ambas señales a la vez que se producía daño también encontramos que la proliferación de las glías estaba alterada ya que el índice mitótico fue significativamente menor al observado en discos dañados. Debido a que para sobreexpresar ambos ARN de interferencia utilizamos tres elementos *UAS* (*UAS-rpr*, *UAS-dpp^{ARNi}* y *UAS-hh^{ARNi}*) cabía la posibilidad de que el fenotipo se debiera a un efecto de dosis génica, por lo que también se cuantificaron discos controles en donde se sobreexpresaron tres elementos *UAS* (*UAS-rpr/+; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-GFP; UAS-RFP*) (Figura 34 A). En estos discos el número de células gliales fue similar al de los discos control dañados que habíamos utilizado previamente. Cuando bloqueamos ambas rutas de forma simultánea en discos que no habían sido dañados (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS-dpp^{ARNi}; UAS-hh^{ARNi}/+*) no se produjo ningún efecto apreciable en el número de glías retinales. Estos datos sugieren que en la activación de la RRG ambas rutas de señalización tienen una función parcialmente redundante.



RESULTADOS.

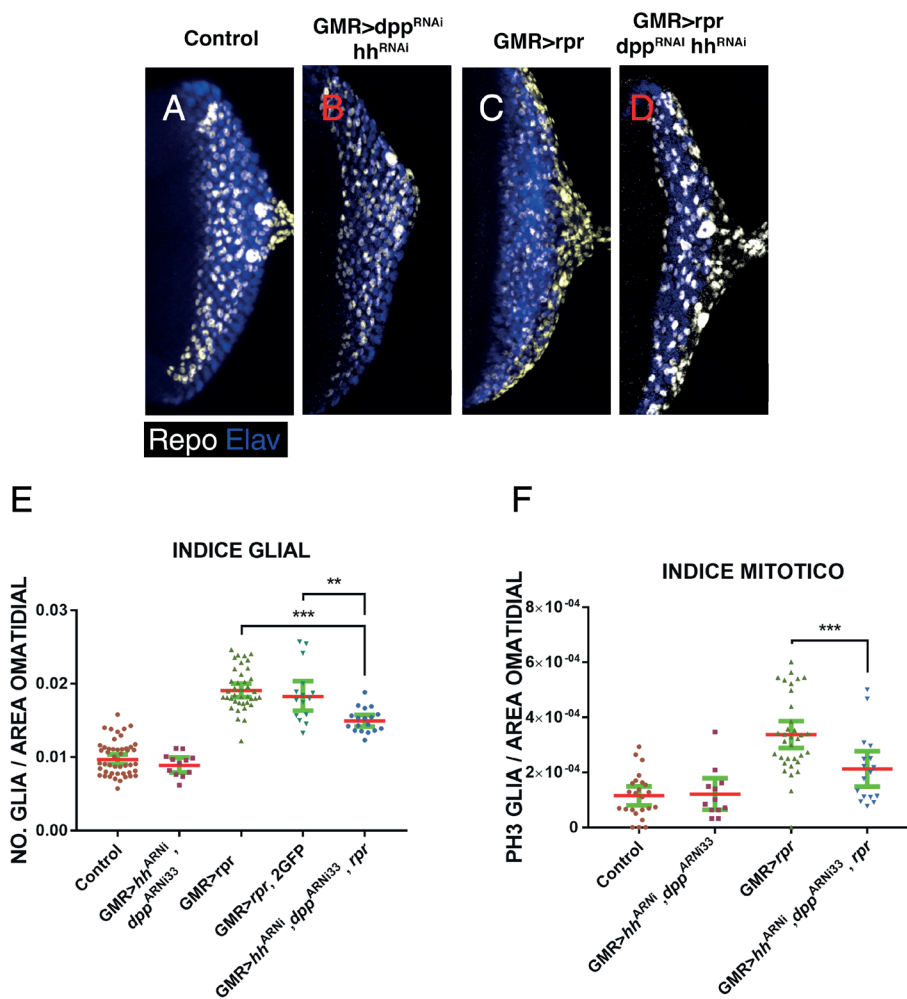


Figura R34. La sobreexpresión simultánea de ARN de interferencia para *hh* y *dpp* en el disco altera la migración y proliferación glial. (A-B) Se muestran discos: control (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/UAS GFP*); cuando se bloquea simultáneamente *dpp* y *hh* en discos *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/ UAS-dpp^{ARNi33618} ; UAS-hh^{ARNi}/+* (*GMR> hh^{ARNi} dpp^{ARNi33}*); discos dañados *UAS-rpr*; *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* (*GMR>rpr*) y discos dañados en los que se bloquea *dpp* y *hh*, *UAS-rpr*; *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*; *UAS-dpp^{ARNi33618} ; UAS-hh^{ARNi}/+* (*GMR> hh^{ARNi} dpp^{ARNi33} rpr*). Los discos se tiñeron con el arcador neuronal Elav en azul y el marcador de núcleos gliales Repo. **(G-H)** Densidad glial e índice mitótico glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicó la prueba de Mann-whitney para comparar “Control” = “*GMR> hh^{ARNi} dpp^{ARNi}*”, sin encontrar diferencias significativas en el índice glial (G) y mitótico (H) $P=0.3559$ (Control $n=47$ y *GMR> hh^{ARNi} dpp^{ARNi}* $n=12$) para el índice glial y $P=0.9802$ (Control $n=24$, *GMR> hh^{ARNi} dpp^{ARNi}* $n=12$) para el índice mitótico. Se aplicaron las pruebas de Anova y Tukey al comparar el índice glial $^{**}P=0.001$ $^{***}P=0.0001$ (*rpr 2GFP* $n=15$, *GMR>rpr* $n=39$, *GMR> rpr hh^{ARNi} dpp^{ARNi}* $n=18$) y el índice mitótico de “*GMR>rpr*” > “*GMR> rpr hh^{ARNi} dpp^{ARNi}*” $P=^{***}$ ($n=34$, y $n=17$ respectivamente). Las barras de error representan IC 95%

2.5.1. La sobreexpresión de *dpp* y *hh* en el disco de ojo promueve la migración y proliferación glial.

Los resultados anteriores indican que la señalización de las rutas de Dpp y de Hh podrían converger para controlar genes necesarios para la proliferación y motilidad glial. En vista de que Dpp y Hh son proteínas difusibles que podrían señalizar sobre las células gliales, se decidió sobreexpresar simultáneamente tanto Hh como Dpp en el disco de ojo y analizar si esta doble activación producía un

fenotipo igual o más fuerte que el producido por la activación individual de estos elementos tras dañar los discos. Para ello, se analizaron discos de tercer estadio larvario en los que se sobreexpresó *dpp* y *hh* (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*; *UAS-hhGFP/ UAS-dpp*) y se compararon con discos control a los que se indujo ablación genética. Fue así como pudo corroborarse que la sobreexpresión simultánea de ambos elementos en el disco de ojo provocó un incremento en el índice glial y en el índice mitótico (Figura R35 A-D). El incremento en el índice glial es similar al que se produce con la sobreexpresión individual de *dpp*, y menor al que produce la inducción del daño (Figura R35 D). Si bien la sobreexpresión individual de *hh* o *dpp* en el disco de ojo no produjo ningún cambio significativo en la proliferación glial, la activación simultánea de ambas rutas incrementó de forma significativa el índice mitótico glial, este aumento es similar al producido en discos dañados (Figura R35 D). En conjunto, estos datos sugieren que ambas rutas colaboran para aumentar la proliferación glial en el disco de ojo a niveles que sólo el daño provoca. Por otro lado, encontramos que el incremento en la motilidad glial causado por la sobreexpresión de *dpp* desaparece cuando se expresa a la vez la proteína difusible Hh.

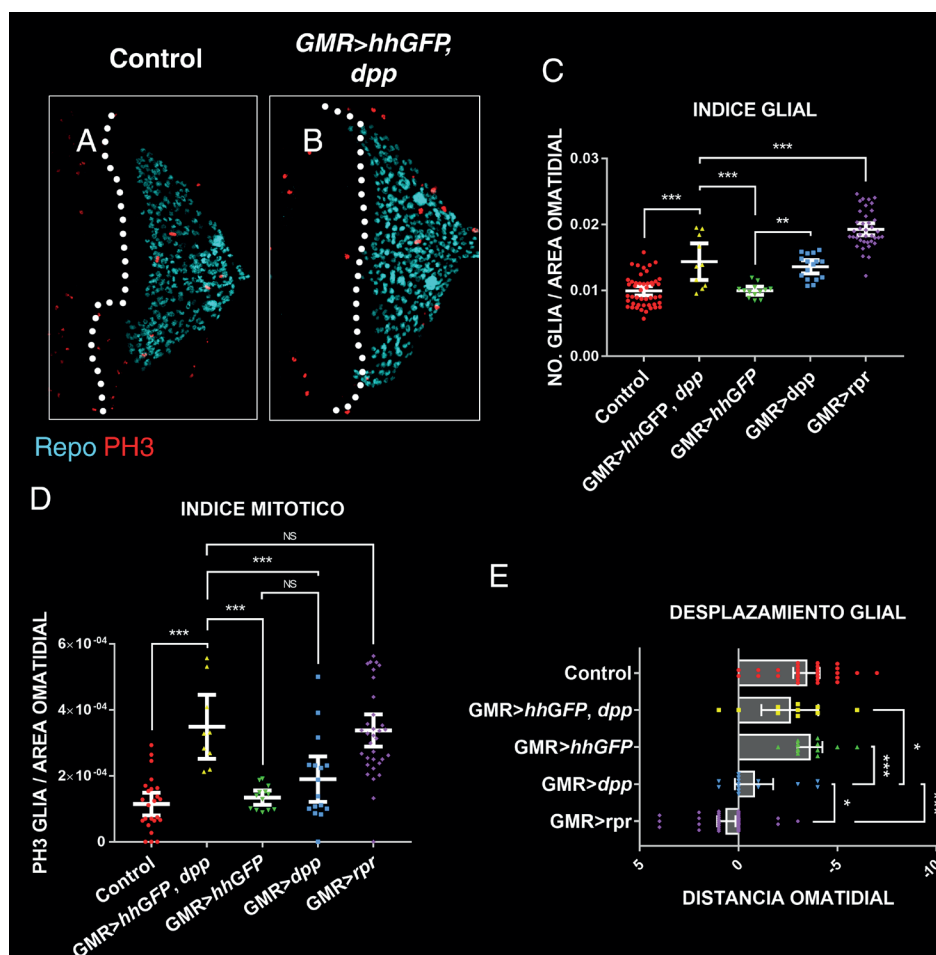


Figura R35. La expresión simultánea de *dpp* y *hh* en el disco de ojo promueve la proliferación glial (A y B) Discos *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* control (A) y discos en los que se sobreexpresó *hh* y *dpp*, *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*; *UAS-hhGFP/ UAS-dpp* (*GMR>hhGFP, dpp*). Los discos fueron teñidos con los marcadores Repo en cyan y PH3 en rojo. La línea punteada en los discos marca el LNA. **(C-E)** Representaciones gráficas que muestran la densidad de células gliales (C), el índice proliferativo (D) y el desplazamiento glial (E) de discos “*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*” (control), “*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+*; *UAS-hhG*

RESULTADOS.

FP/ UAS-dpp" (GMR>hhGFP, dpp), "GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-hhGFP" (GMR>hhGFP), "GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+; UAS-dpp/+ " (GMR>dpp) y "UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+ " (GMR>rpr). (C) Gráfico que representa el índice glial. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: "Control" < "GMR>hhGFP, dpp", "GMR>hhGFP" < "GMR>hhGFP, dpp", "GMR>dpp" = "GMR>hhGFP, dpp", "GMR>rpr" > "GMR>hhGFP, dpp" y "GMR>dpp" > "GMR>hhGFP" con un nivel de significancia de ***=P<0.0001 (Control n=47, GMR>hhGFP, dpp n=17, GMR>hhGFP n=21 y GMR>dpp n=24 y GMR>rpr n=24 respectivamente). (D) Estimación de la proliferación glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: Control" < "GMR>hhGFP, dpp", "GMR>hhGFP" < "GMR>hhGFP, dpp", "GMR>dpp" < "GMR>hhGFP, dpp", "GMR>rpr" = "GMR>hhGFP, dpp" y "GMR>dpp" = "GMR>hhGFP" ***=P=0.2451 (Control n=47, GMR>hhGFP, dpp n=17, GMR>hhGFP n=21 y GMR>dpp n=24 y GMR>rpr n=24 respectivamente). (E) Medición del desplazamiento glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: "Control" = "GMR>hhGFP, dpp", "GMR>hhGFP" = "GMR>hhGFP, dpp", "GMR>dpp" > "GMR>hhGFP, dpp", "GMR>rpr" > "GMR>hhGFP, dpp" y "GMR>dpp" > "GMR>hhGFP" P=0.2379 y 0.5675 (Control n=47, GMR>hhGFP, dpp n=17, GMR>hhGFP n=21 y GMR>dpp n=24 y GMR>rpr n=24). Las barras de error representan IC 95%.

2.5.2. La co-expresión de los receptores Tkv y Ihog en las células gliales induce la migración y proliferación glial.

Puesto que la expresión simultánea de *hh* y *dpp* en el epitelio del ojo promueve de manera no autónoma la migración y proliferación de las células gliales, el siguiente experimento que nos planteamos fue activar ambas rutas directamente en las células gliales. Para conseguirlo se sobreexpresaron la proteína transmembrana Ihog que promueve la actividad de la ruta de Hh y una forma constitutivamente activada del receptor Tkv (Tkv^{QD}) de la ruta de Dpp. Ambos factores fueron sobreexpresados durante 4 días utilizando la línea *tub-Gal80^{TS}; repo-Gal4*. En discos de larvas *repo-Gal4/UAS-tkv^{QD}* observamos que la densidad glial y el índice mitótico glial (Figura R36 B) aumentó respecto al número de estas células en discos control (Figura R36 A, F y G). Por otra parte, contabilizamos el número de discos en los que la glía migraba ectópicamente sobrepasando el LNA (línea punteada en Figuras R36 A-E y Figura R36 H). Cuando se sobreexpresó *UAS-tkv^{QD}* con *repo-Gal4* se encontró que en la mayoría de los discos de ojo analizados las glías habían migrado cerca del LNA, pero sin llegar a superarlo (línea punteada en Figura R6 B), como ocurre en los discos control (Figura R36 A).

Este efecto en la migración y proliferación glial aumentó cuando se sobreexpresaron tanto *tkv^{QD}* como el co-receptor *Ihog* en las células gliales (*repo-Gal4 UAS-ihog/ UAS-tkv^{QD}*). La sobreexpresión de ambos receptores membranales fue suficiente para que el número de glías fuera mayor que el ocasionado por la sobreexpresión individual de *tkv^{QD}* o la de *ihog* (Figuras R 36 B, C, D y F), e incluso superior al incremento ocasionado por la inducción de la muerte (Figuras R36 E y F). En cuanto al índice mitótico glial, las larvas *repo-Gal4 UAS-ihog UAS-tkv^{QD}* presentaron discos de ojo con un fuerte aumento en el número de glías marcadas con PH3, superior al de discos *repo-Gal4 UAS-tkv^{QD}* (Figuras R36 B, C y G) y similar al ocasionado por la muerte (Figuras R 36 E y G). En la mayoría de los discos de ojo analizados donde se sobreexpresaron *UAS-ihog UAS-tkv^{QD}* con *repo-Gal4* se produjo migración ectópica de células

gliales que llegaron a superar el LNA (Flechas en Figura R36 C).

Nuestros resultados sugieren que, en las células gliales, las rutas de Dpp y Hh colaboran para promover la proliferación y migración glial.

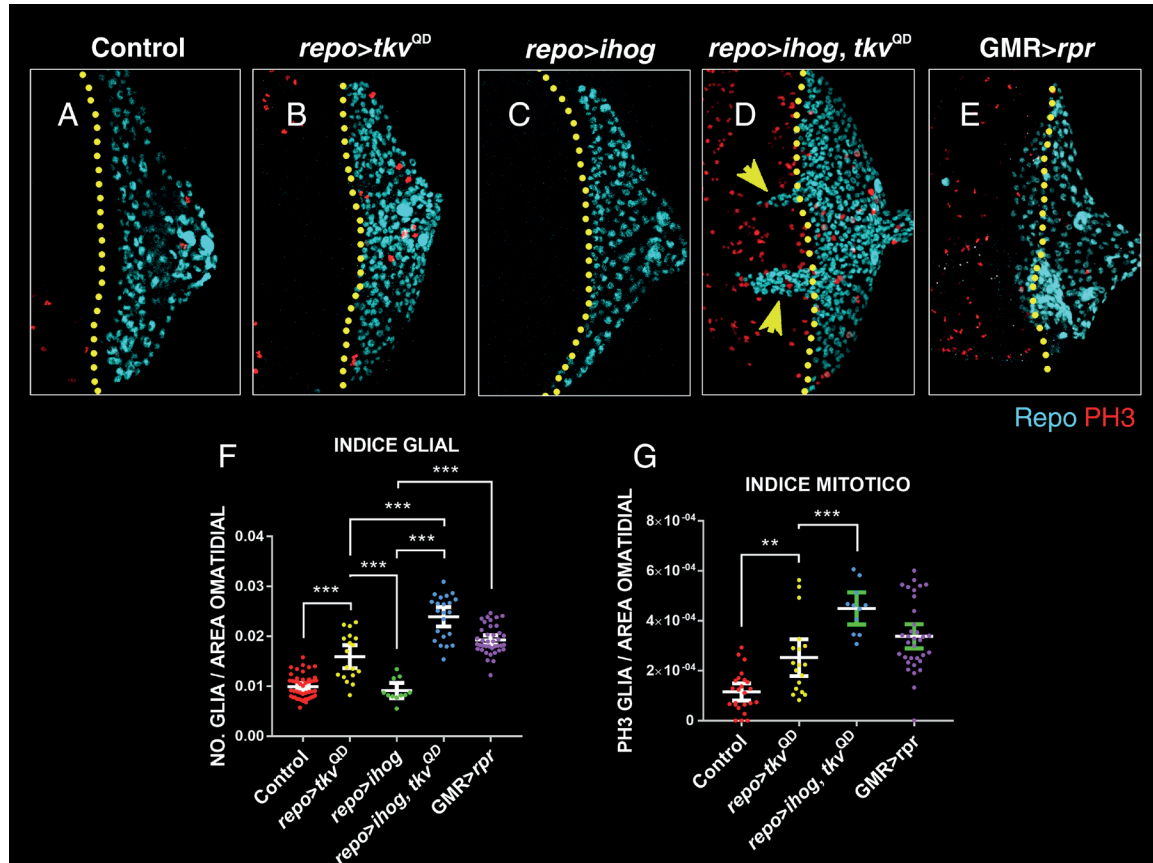


Figura R36. La co-expresión de *tkv^{QD}* y *ihog* en la glía promueve la migración y proliferación de estas células. (A-E) Discos de larvas controles (A), *repo-Gal4; UAS-tkv^{QD}/+* (B), *repo-Gal4 UAS-ihog*, (C), *repo-Gal4 UAS-ihog/UAS-tkv^{QD}* (D) y discos dañados *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/+* (E). Los discos se tiñeron con los marcadores PH3 en rojo y Repo en cyan. La línea punteada en los discos marca el LNA. **(F-H)** Representaciones gráficas que muestran la densidad glial (F), el índice proliferativo (G) de discos con los genotipos anteriores. **(F)** Gráfico donde se representa el índice glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: “control” < “*repo>tkv^{QD}*”, “control” = “*repo>ihog*”, “control” < “*repo>ihog, tkv^{QD}*”, “*repo>ihog*” < “*repo>ihog tkv^{QD}*”, “*repo>tkv^{QD}*” < “*repo>ihog tkv^{QD}*” y “*GMR>rpr*” < “*repo>ihog tkv^{QD}*” con un nivel de significancia de ***= $P < 0.0001$ (control $n=47$, *repo>tkv^{QD}* $n=18$, *repo>ihog* $n=11$ y *repo>ihog tkv^{QD}* $n=22$, *repo>tkv^{QD}* $n=18$, *GMR>rpr* $n=39$). **(G)** Estimación de la proliferación glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: “control” < “*repo>tkv^{QD}*”, “control” = “*repo>ihog*”, “control” < “*repo>ihog tkv^{QD}*”, “*repo>ihog*” < “*repo>ihog tkv^{QD}*”, “*repo>tkv^{QD}*” < “*repo>ihog tkv^{QD}*” y “*GMR>rpr*” = “*repo>ihog tkv^{QD}*” con un nivel de significancia de **= $P < 0.0053$ ***= $P < 0.0001$ (control $n=24$, *repo>tkv^{QD}* $n=18$, y *repo>ihog, tkv^{QD}* $n=11$, *GMR>rpr* $n=34$). Las barras de error representan IC 95%.

RESULTADOS.

2.6. Interacción genética entre la ruta de Dpp y JNK durante la migración glial.

2.6.2. La sobreexpresión de Dpp en el disco de ojo induce la activación no autónoma de la vía de JNK en las células gliales.

Para completar el análisis acerca de la relación funcional entre la vía de Dpp y la JNK, hemos examinado si la sobreexpresión de *dpp* en el disco de ojo puede modificar la actividad de la vía JNK de forma no autónoma en las células gliales. Con este fin sobreexpresamos *UAS-dpp* en la región del ojo bajo el control de *GMR-Gal4* y se analizó el patrón de expresión del reportero *TRE-GFP*. Observamos que en discos de larvas *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP; UAS-dpp/+* mantenidas durante 4 días a 29°C, el porcentaje de células gliales que expresaban TRE-GFP a altos niveles fue mayor que el encontrado en discos control (*GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP*) (Figuras R37 C', C'', G', G'' y I). Este aumento en la actividad de la JNK no es una consecuencia de un incremento de Eiger, ya que la sobreexpresión de *GMR-Gal4 UAS-dpp* no cambia los niveles de este ligando (Figuras R37 H' y H'').

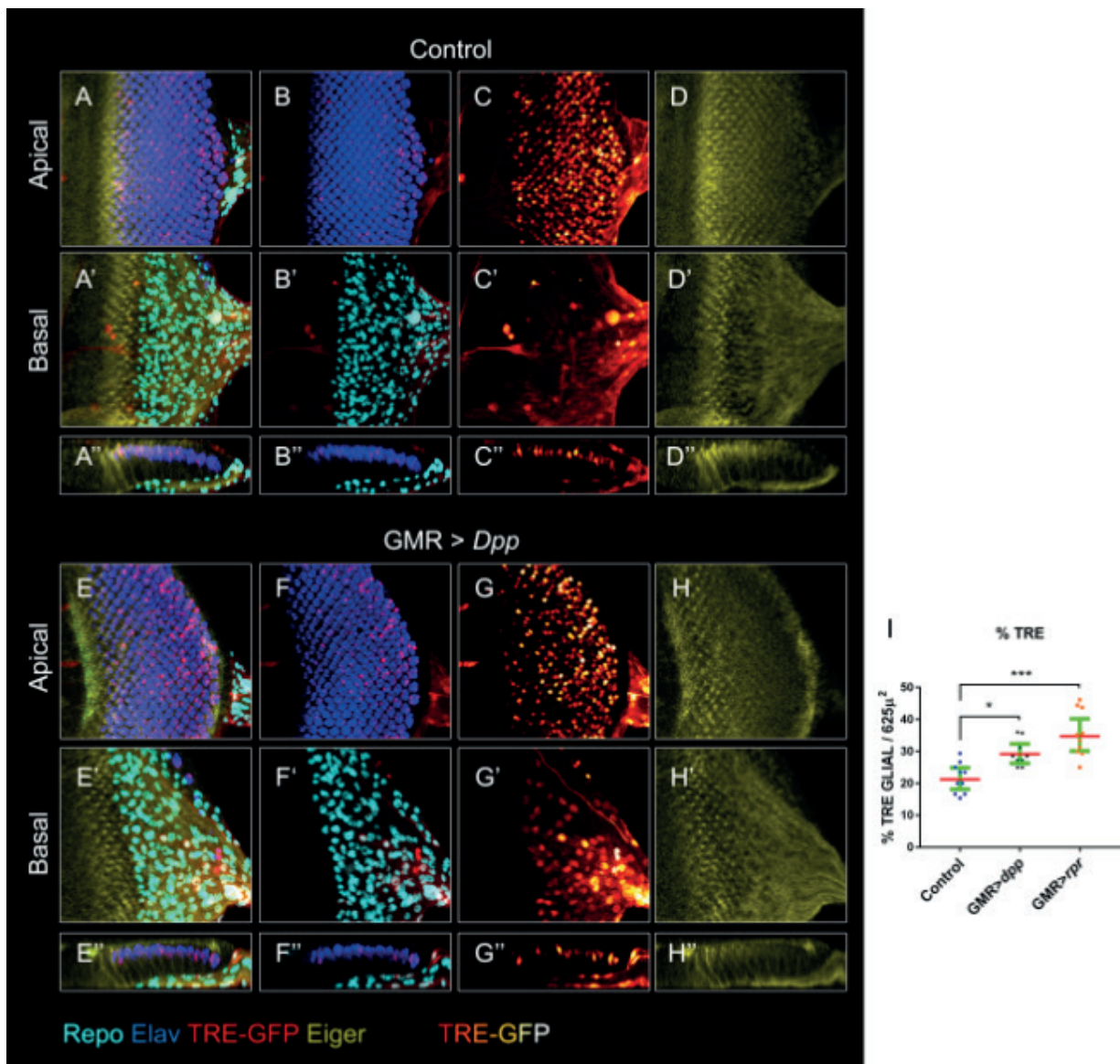


Figura R37. La sobreexpresión de *dpp* en el disco de ojo induce la activación no autónoma de la vía de JNK en las células gliales. (A-H'') Discos de ojo control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP* (A-D'') y *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP; UAS-dpp/+* (E-H'') diseccionados tras 4 días de ablación genética. Los discos fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul, el marcador nuclear de células gliales Repo en cian, el anticuerpo para Egr en amarillo y expresan el reportero de TRE-GFP (en gradiente de rojo a blanco donde la degradación hacia el blanco indica mayor concentración). Planos apicales (A, A', E, E'), planos basales (B, B', F, F'). C-D'' y G-H'' son cortes transversales de los discos. **(A-D'')** Señal de la actividad de la vía de la JNK endógena en neuronas fotorreceptoras y células gliales. **(E-H'')** La sobreexpresión de *UAS-dpp* en el disco de ojo provoca el incremento de la expresión e intensidad del reportero TRE-GFP en las células gliales (G-G''). La señal de Egr no cambia (H, H', H''). **(I)** Medición del número de glías que expresan TRE-GFP en una ratio de 650 μm^2 . Se aplicaron las pruebas de Anova y Tukey para comparaciones múltiples. Sólo se encontraron diferencias significativas entre "Control" < "*dpp*" y "Control" < "*GMR>rpr*" *=P=0.001 ***=P=0.0001 (n=39, n=13 y n=10 respectivamente). Las barras de error representan IC 95%

Hemos usado el reportero *puc2b-LacZ* para verificar si la expresión ectópica de *UAS-dpp* bajo el control de *GMR-Gal4* es suficiente para activar la ruta de la JNK en las células gliales. Al igual que lo observado con *TRE-GFP*, se encontró que en discos en los que se sobreexpresa *UAS-dpp* se incrementa el número de células en las que se activa el reportero *puc2b-LacZ* comparado con discos controles (Figuras R38 B-C' y E-F'). Los resultados anteriores sugieren que la proteína difusible Dpp que se expresa en el tejido ocular es capaz de activar de manera no autónoma a la vía JNK en las células gliales.

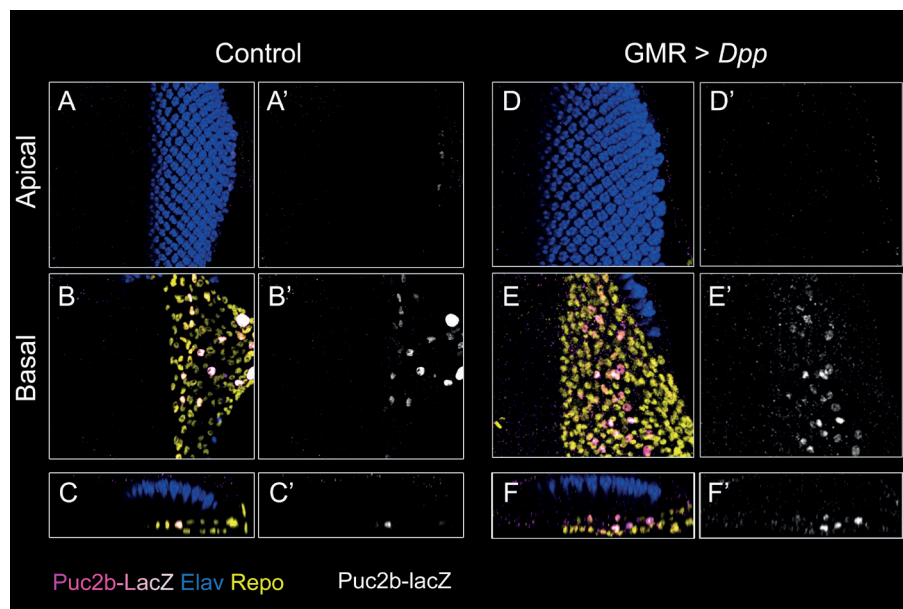


Figura R38. Activación del reportero *puc2b-LacZ* en las células gliales al sobreexpresar *dpp*. (A-H'') Se muestran discos de larvas de genotipo control *GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/puc2b-LacZ* (A-C') y de genotipo *UAS-rpr; GMR-Gal4 tub-Gal80^{TS}/puc2b-LacZ; UAS-dpp/+* diseccionados después de 4 días de ablación genética (D-F') que fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul, el marcador glial Repo en amarillo y anti- β Gal (anti- β Galactosidasa) para mostrar la expresión de *puc-LacZ* (gradiente de rosa a blanco en A-F y gris en A'-F'). C, C', F y F' son cortes transversales. **(A-C')** La expresión del reportero *puc-LacZ* se observó en algunas células gliales y en fotorreceptores del margen posterior del disco. **(D-F')** En discos con sobreexpresión de Dpp se incrementó el número de glías que expresaron el reportero.

RESULTADOS.

2.6.3. Activación de la vía Dpp en la glía mediante la sobreexpresión *tkv^{QD}*.

Puesto que la expresión del morfógeno Dpp en el disco de ojo indujo la activación no autónoma de la vía JNK en las células gliales, examinamos si la activación de esta vía en la glía era suficiente para promover las actividades de la vía JNK de manera autónoma en estas células. Para ello, sobreexpresamos la forma constitutivamente activada de *tkv* (*UAS-tkv^{QD}*) mediante la línea *repo-Gal4*. Los resultados muestran que la sobreexpresión de esta construcción durante 4 días en larvas *TRE-GFP/+; repo-Gal4/UAS-tkv^{QD}* no produjo ningún cambio significativo en el porcentaje de células gliales que expresan TRE-GFP (Figura R39).

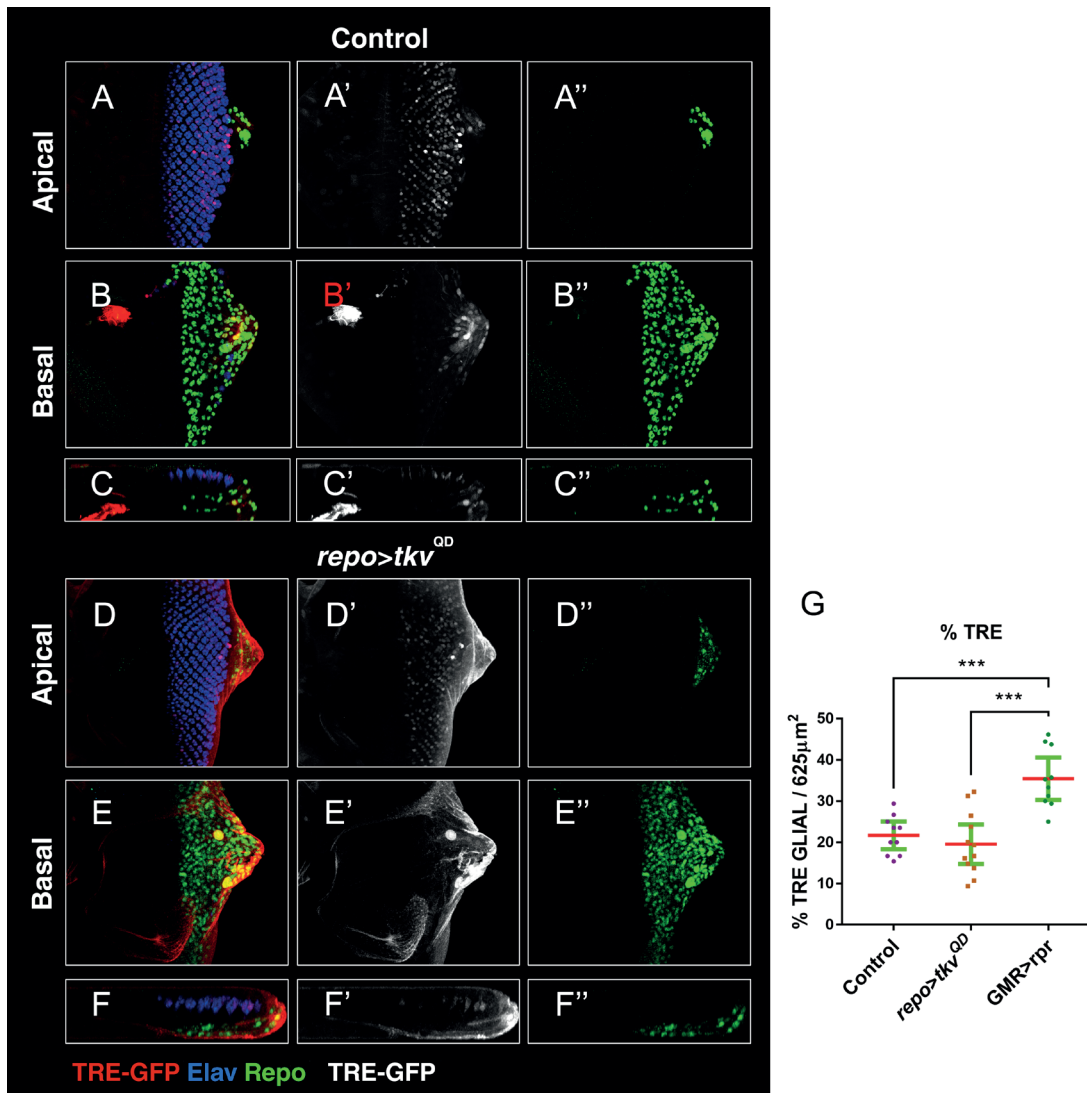
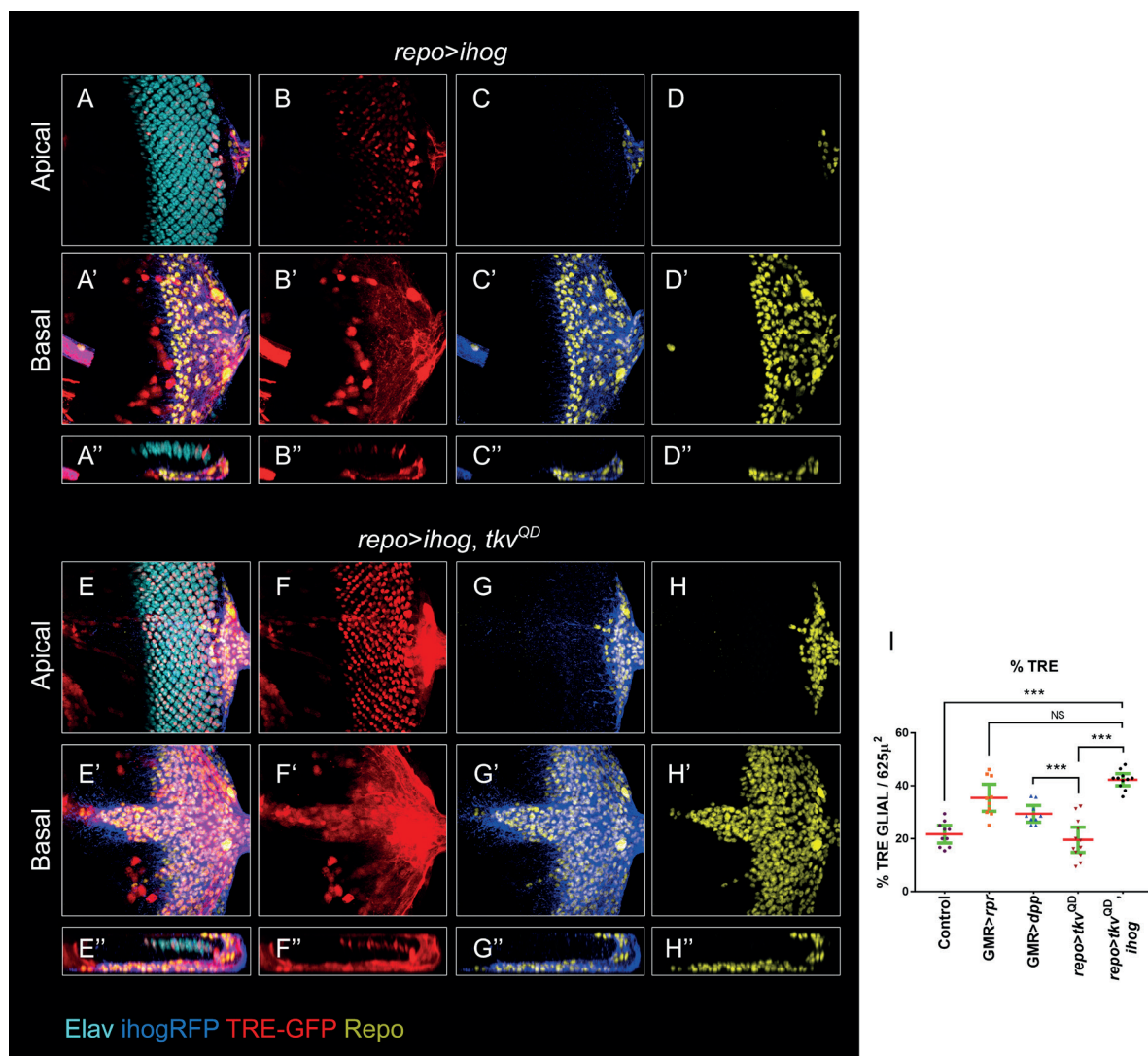


Figura R39. La expresión de TKV^{QD} no es suficiente para activar de manera autónoma la vía JNK en la glía. (A-F'') Discos de ojo control *tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP; repo-Gal4* (A-C'') y discos *tub-Gal80^{TS}/TRE-GFP; UAS-tkv^{QD}/repo-Gal4* diseccionados después de 4 días a 29°C (D-F'') que fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en azul, el marcador nuclear de células gliales Repo en verde y expresan el reportero de *TRE-GFP* en rojo y gris en A'-F'. C-C'' y F-F'' son cortes transversales de los discos. **(A-C'')** Señal de la actividad la JNK normal en neuronas fotorreceptoras y células gliales. **(D-F'')** La sobreexpresión de *UAS- tkv^{QD}* en la glía no provocó ningún cambio en la expresión del reportero TRE-GFP en estas mismas células (D'-F'). **(I)** Medición del número de glías que expresan TRE-GFP en un ratio de 625 μm^2 . Se aplicó la prueba de Mann-Whitney y no se

encontraron diferencias significativas entre el tratamiento control y los discos *repo-Gal4 UAS-tkv^{QD}*. Se comparó “*repo4>t-kv^{QD}*” < “*GMR>rpr*” $P=0.0435$ ($n=39$, $n=13$ y $n=10$). Las barras de error representan IC 95%

2.6.4. La activación simultánea de las vías de Dpp y Hh en la glía provoca la activación autónoma de la vía JNK.

Hemos demostrado que la activación simultánea de Dpp y Hh en las células gliales exagera los fenotipos que se producen cuando se activan de manera individual. Por lo que decidimos examinar los efectos en la actividad de la JNK cuando ambas rutas son activadas de manera autónoma en las células gliales. Para llevar a cabo este experimento co-expresamos *UAS-tkv^{QD}* y *UAS-ihog* con *repo-Gal4* durante 4 días y analizamos la expresión de *TRE-GFP*. En estos discos observamos que se incrementa de forma significativa el ratio de células gliales que expresan este reportero a altos niveles comparados con discos controles y discos *repo-Gal4; UAS-tkv^{QD}* sometidos al mismo tratamiento (Figura R40 y 41). Este incremento en el ratio de glías con *TRE-GFP* es similar al incremento ocasionado cuando se induce daño (Figura R41 I). Estos resultados indican que las rutas de Hh y Dpp actúan de manera sinérgica para activar a la vía de JNK en las glías.



RESULTADOS.

Figura R40. La expresión simultánea los receptores *ihog* y *tkv^{Qd}* en la glía provoca la activación autónoma de la vía JNK. Discos de ojo *repo-Gal4 UAS-ihog/TRE-GFP* (A-D'') y *repo-Gal4 UAS-ihog/TRE-GFP; UAS-tkv^{Qd}* diseccionados después de 4 días 25°C (E-H'') que fueron teñidos con el marcador neuronal Elav en cian, el marcador nuclear de células gliales Repo en amarillo, y expresan el reportero de *TRE-GFP* (en gradiente de rojo a blanco donde la degradación hacia el blanco indica mayor concentración) y *ihogRFP* en azul. Planos apicales (A, A', E, E'), planos basales (B, B', F, F'). C-D'' y G-H'' son cortes transversales de los discos. **(A-D'')** La actividad de vía de la JNK cuando se expresa *UAS-ihog* con *repo-Gal4* no cambia en las células gliales. **(E-H'')** La sobreexpresión de *UAS-ihog* y *UAS-tkv^{Qd}* en las células gliales provoca un gran incremento en la expresión e intensidad del reportero *TRE-GFP* en las células gliales (G-G''). **(I)** Medición del número de glías que expresan *TRE-GFP* en un ratio de 650 μm^2 . Se aplicaron las pruebas de Anova y Tukey para comparaciones múltiples. Demostrándose que "*repo4>UAS-tkv^{Qd}, UAS-ihog*" < "*GMR>rpr*", "*repo4>UAS-tkv^{Qd}, UAS-ihog*" > "*GMR>UAS-tkv^{Qd}*" y que no hay diferencias significativas entre "*repo4>UAS-tkv^{Qd}, UAS-ihog*" > "*GMR>rpr*". ***=P=0.0001 (n=12, n=13 y n=15). Las barras de error representan IC 95%

2.7. En los mutantes *hepr⁷⁵* se inhibe el efecto migratorio y proliferativo glial causado por la activación simultánea de las rutas Dpp y Hh.

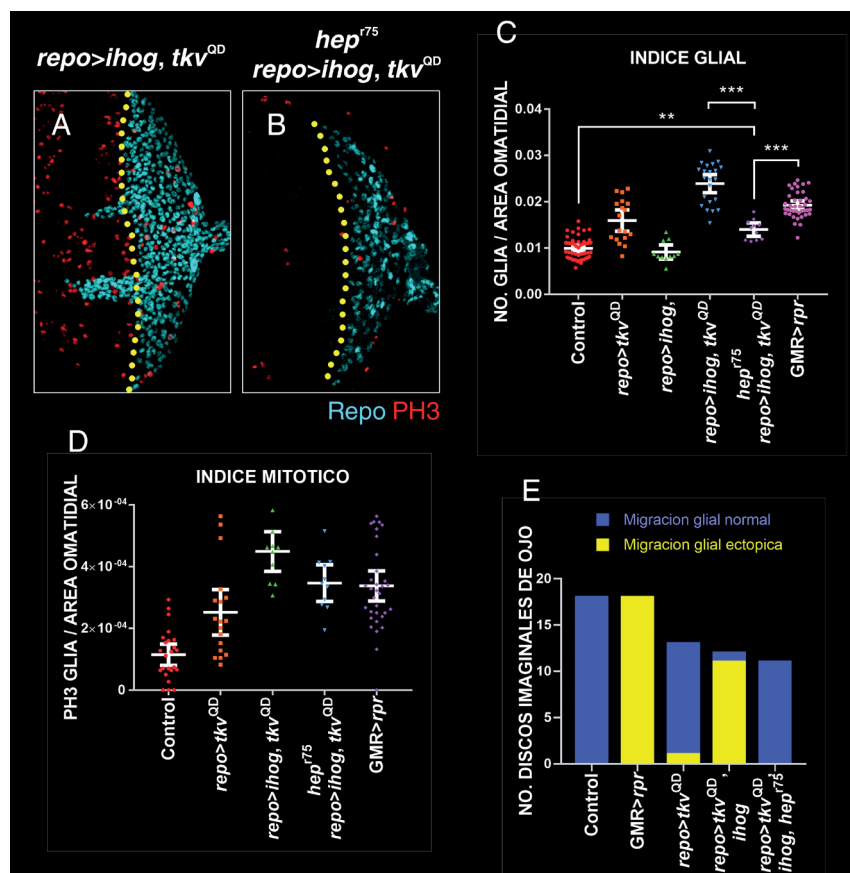
Nuestros resultados indican que la co-activación de las rutas de Dpp y Hh producen un fuerte incremento en la proliferación y migración glial, y un aumento de la actividad de la ruta JNK en estas mismas células. Por otro lado, hemos encontrado que la vía de la JNK juega un papel determinante para promover la migración glial hacia el ojo, tanto durante el desarrollo normal como durante la RRG.

Es por esto que se decidió examinar si el incremento proliferativo y/o migratorio glial causado por la doble activación de *ihog* y *Tkv* podría ser mediado por la ruta de la JNK. Con este fin, hemos estudiado los efectos producidos al activar ambas rutas de señalización en un fondo mutante para JNK. Como se observa en las figuras R41 B y C, encontramos que en larvas mutantes para *hep* (*hep^{R75}/hep^{R75}; repo-Gal4 UAS-ihog/UAS-tkv*) el incremento en el índice glial causado por la sobreexpresión de ambos factores se suprimió. Cabe recalcar que la falta de función del gen *hep* no afecta al incremento proliferativo causado por la doble expresión de *tkv* y *ihog*. Esto sugiere que la vía de la JNK no está involucrada en la respuesta proliferativa que produce la activación de las rutas de Hh y Dpp. También se comprobó que en un fondo mutante para *hep^{R75}* se suprime el efecto de la migración ectópica causada por la doble expresión de *tkv* e *ihog* (Figuras R42 C, D y H).

Figura R41. La falta de función de *hep^{R75}* inhibe el efecto migratorio y proliferativo glial causado por la activación simultánea de las rutas Dpp y Hh. (A y B) En los discos teñidos con los marcadores Repo en cian y PH3 en rojo. Los discos *hep^{R75}/hep^{R75}; repo-Gal4 UAS-ihog/+; UAS-tkv^{Qd}/+* (A) desaparece la migración ectópica que se produce en discos *repo-Gal4 UAS-ihog/+; UAS-tkv^{Qd}/+*. La línea punteada en los discos marca el LNA. **(C-D)** Representaciones gráficas que muestran el número de células gliales (C) y el índice proliferativo (D) de discos con los genotipos mencionados que fueron sometidos al protocolo 3-4-0. **(C)** Gráfico que representa el índice glial. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: "*Control*" < "*hep^{R75}, repo> ihog, tkv^{Qd}*", "*repo>ihog*" = "*hep^{R75}, repo> ihog, tkv^{Qd}*", "*repo> tkv^{Qd}*" = "*hep^{R75}, repo> ihog, tkv^{Qd}*", "*GMR>rpr*" > "*hep^{R75}, repo> ihog, tkv^{Qd}*" y "*GMR>rpr*" < "*repo> ihog,*

RESULTADOS.

tkv^{Qd} con un nivel de significancia de $**=P=0.0028$ $***=P<0.0001$ (Control $n=47$, *hep^{R75}*, *repo>ihog*, *tkv^{Qd}* $n=11$, *repo>ihog* $n=11$, *epo>ihog*, *tkv^{Qd}* $n=22$, *repo>tkv^{Qd}* $n=18$ y *GMR>rpr* $n=39$). **(D)** Estimación de la proliferación glial de discos con los genotipos anteriores. Se aplicaron las pruebas Anova de una vía y Tukey para comparaciones múltiples para contrastar los tratamientos: Control $<$ "*hep^{R75}*, *repo>ihog*, *tkv^{Qd}*", "*repo>ihog*" = "*hep^{R75}*, *repo>ihog*, *tkv^{Qd}*", "*repo>tkv^{Qd}*" = "*hep^{R75}*, *repo>ihog*, *tkv^{Qd}*", "*GMR>rpr*" = "*hep^{R75}*, *repo>ihog*, *tkv^{Qd}*" y "*GMR>rpr*" = "*repo>ihog*, *tkv^{Qd}*" (Control $n=24$, *hep^{R75}*, *repo>ihog*, *tkv^{Qd}* $n=11$, *repo>ihog*, *tkv^{Qd}* $n=11$, *repo>tkv^{Qd}* $n=18$ y *GMR>rpr* $n=34$). Las barras de error representan IC 95%. **(E)** Medición de la migración ectópica glial denotada el número de discos con glías sobrepasando el LNA. La mayoría de los discos de ojo con sobreexpresión de los receptores Tkv y Ihog con *repo-Gal4* se produjo migración ectópica de células gliales que llegaron a superar el LNA (Control $n=18$, *hep^{R75}*, *repo>ihog*, *tkv^{Qd}* $n=11$, *epo>ihog*, *tkv^{Qd}* $n=12$, *repo>tkv^{Qd}* $n=13$ y *GMR>rpr* $n=18$). Las barras de error representan IC 95%.



En conjunto, estos resultados indican que las rutas de Hh y Dpp tienen una relación funcional durante la migración glial y pueden actuar de manera sinérgica para activar a la vía JNK en las células gliales y promover el desplazamiento glial. Por otro lado, de manera independiente a la vía JNK, la activación simultánea de Dpp y Hh puede promover el incremento de la proliferación glial.

DISCUSIÓN

Una de las principales consecuencias asociadas a una lesión neuronal en el SNC es la estimulación de las células gliales para que desempeñen diversas funciones homeostáticas en la zona dañada. Entender los mecanismos y los tipos celulares implicados en este tipo de respuesta es fundamental para comprender las bases de muchas enfermedades neurogénicas. En la presente tesis doctoral hemos modelado este tipo de respuesta en el disco imaginal de ojo de *Drosophila*, ya que las peculiaridades de cómo se desarrolla esta estructura hacen de él un modelo idóneo para establecer nuevos mecanismos acerca de cómo se controla la actividad glial. Además, al ser un tejido donde se lleva a cabo un proceso neurogénico independiente al resto del Sistema Nervioso Central, podemos analizar las consecuencias de la inducción de la muerte celular sin comprometer la integridad del organismo. Para este trabajo elegimos la ablación genética como método de lesión neuronal en este epitelio porque permite tener un control espacio-temporal de la inducción del daño. En nuestro caso indujimos la ablación genética por medio de la sobreexpresión del gen pro-apoptótico *reaper* (*rpr*). Nuestros resultados nos han permitido identificar qué tipo de respuesta regenerativa glial ocurre cuando los discos de ojo son dañados. Esta respuesta se caracteriza por el incremento de la migración y la proliferación glial. Gracias a diferentes experimentos de falta de función y sobreexpresión genética hemos podido definir que esta respuesta está regulada por rutas de señalización que funcionan a larga distancia como son las de Hh y Dpp. Además, hemos identificado que la vía de la JNK es necesaria para mediar la respuesta regenerativa glial promovida por estas dos rutas de señalización.

1. La ablación genética en discos de ojo desencadena una respuesta homeostática que promueve la integridad epitelial.

El ojo de *Drosophila* es un modelo muy versátil que ha sido utilizado para analizar el papel que juegan diversas vías de señalización regulando muchos procesos celulares como son la muerte celular, el cambio de identidad, la regeneración, la migración glial o la proliferación (Meserve y Duronio, 2018; Tavares *et al.* 2017; Baonza *et al.*, 2002; Hummel *et al.*, 2002; Rangarajan *et al.*, 2001). Puesto que el ojo no es una estructura fundamental para la supervivencia de este díptero se pueden llevar a cabo estudios de muerte celular masiva en este epitelio sin causar letalidad en la mosca. Como había sido previamente publicado por otros grupos (Fan y Bergmann, 2014; White *et al.*, 1996) observamos que la inducción de muerte en la región posterior al surco morfogenético se produce de forma muy heterogénea. En nuestro caso, encontramos que, aunque algunos fotorreceptores mueren al sobreexpresar *reaper*, la mayoría de las células que entran en apoptosis son células intermatidiales. Se ha observado que las células más sensibles a morir en la región posterior al SM son las células mitóticamente activas, mientras que las células postmitóticas han desarrollado varias estrategias para promover la supervivencia. Un ejemplo de estas estrategias lo encontramos en las neuronas fotorreceptoras. En estas células se acumula el inhibidor de la apoptosis DIAP1, mientras que en aquellas células que no han sido especificadas como fotorreceptores, la ligasa E3 de ubiquitina Cullin-3 mantiene los niveles de DIAP1 bajos haciéndolas más susceptibles de entrar en apoptosis. Otro fenómeno que ejemplifica la diferencia de susceptibilidad a entrar en apoptosis de las células que se encuentran en la región posterior del SM, es que a medida

DISCUSIÓN.

que avanza el desarrollo, los fotorreceptores más antiguos se re-sensibilizan a las señales apoptóticas debido a que degradan DIAP1. Lo que explicaría que en nuestros experimentos aparezca una banda paralela al SM de células fuertemente afectadas, a pesar de que la sobreexpresión de *rpr* se induce en toda la región posterior del disco (Fan y Bergmann, 2014 y Christiansen *et al.* 2013)

La sobreexpresión de *rpr* en el ojo fue suficiente para producir muerte celular masiva debido a que puede inducir por si sólo la ubiquitinación del inhibidor de la apoptosis DIAP1 (Yoo *et al.*, 2002). Además, se ha demostrado que es capaz de asociarse con las demás moléculas pro-apoptóticas (Grim y Hid) para incrementar el efecto de la muerte celular (Sandu *et al.*, 2010). Nuestros datos indican que la sobreexpresión de forma individual de otros genes pro-apoptóticos como son *hid* y *hep^{CA}* no es suficiente para producir una muerte masiva en los discos de ojo (figura R1), a pesar de que los ojos adultos derivados de estas larvas (*GMR-hid* y *GMR-hep^{CA}*) están muy afectados y son significativamente menores que los ojos control (Ma *et al.*, 2012; Sandu *et al.*, 2010; Geuking *et al.*, 2009 y Hays *et al.*, 2000). Esto podría explicarse si las células de los discos de ojo son más susceptibles a los efectos de Hid y Hep en etapas tardías del desarrollo. Una posible explicación de porque Hid no es capaz de inducir apoptosis de forma masiva en estadios tempranos del desarrollo del disco de ojo, podría deberse al hecho de que esta proteína pro-apoptótica no es capaz por si sola de promover la degradación de DIAP1 (Hays *et al.*, 2002). De manera que, los altos niveles de este factor en muchas de las células que forman el disco de ojo bloquearían la acción de Hid. Esto sugiere que existen diferencias significativas entre los mecanismos por los que Rpr y Hid inducen apoptosis en el disco de ojo.

El sistema *Gal4/Gal80/UAS* no sólo nos permitió controlar de forma específica la región en donde se produjo el daño, sino que también nos permitió manipular el tiempo al que sometemos a los discos a la ablación genética. Nuestros datos indican que 8 horas después de la sobreexpresión de *UAS-rpr* comienzan a aparecer células apoptóticas. Si se prolonga la expresión del gen pro-apoptótico durante 24 horas se consigue inducir la ablación de un gran fragmento del disco (Figura R3). Como se demuestra en la figura R3 si se aplica este periodo de ablación a inicios del tercer estadio larvario (8 días a 17°C) y se dejan recuperar tras el daño, estos pueden dar lugar a ojos adultos con un tamaño normal. Esto indica que los discos de ojo tienen una gran capacidad de recuperarse cuando son dañados en su región neurogénica. Sin embargo, esta capacidad desaparece cuando el daño ocurre en discos en estadios del desarrollo tardíos. Todo esto indica que los mecanismos que promueven la capacidad regenerativa de los discos de ojo desaparecen durante el desarrollo. Una posible explicación para esta observación podría ser que la pérdida de la capacidad regenerativa coincida con el inicio de la metamorfosis, como ocurre en discos de ala (Hariharan y Serras, 2017; Diaz-Garcia *et al.* 2016). Sin embargo, en el caso del disco de ojo es poco probable que esta sea la única razón, ya que a diferencia de lo que ocurre con los discos de ala, en los que el momento de entrada a la metamorfosis coincide con el fin del periodo proliferativo y el inicio de la diferenciación, en el disco de ojo esto ocurre continuamente durante el desarrollo larvario. A medida que las células entran en el SM, se produce la transición, entre el periodo proliferativo y el de la salida del ciclo. De manera que, es posible que esta pérdida de la capacidad para recuperarse del daño se deba a otros procesos que no estén asociados con la entrada de la metamorfosis.

2. Durante la reparación de la herida se activa la proliferación compensatoria y se acumulan células gliales en la región basal del disco de ojo.

La diferenciación celular en el ojo de *Drosophila* se inicia durante el tercer estadio larvario gracias a una serie de señales que cruzan el eje antero-posterior del ojo. El inicio del avance del Surco Morfogenético (SM) en discos de ojo marca el inicio de la diferenciación celular y promueve la progresión ordenada de las células de este epitelio a entrar en diferentes fases del ciclo celular. Tras el paso del SM un grupo de células quiescentes progresan de manera coordinada a la fase S del ciclo celular por última vez, a este fenómeno se le conoce como “Segunda Oleada Mitótica” (SOM). Esto implica que en la región posterior del disco más alejado del SM la proliferación sea escasa, durante el desarrollo normal (Figura 17).

Cuando se induce daño en la región posterior al SM utilizando la línea *GMR-hid* las células circundantes pueden responder mediante la Proliferación Compensatoria (PC), con excepción de aquellas células que ya están en un proceso de diferenciación neuronal (Meserve y Duronio, 2018). En nuestro modelo de regeneración en el ojo de *Drosophila* los *GMR-rpr* presentan una apoptosis masiva en la región posterior del SM (Figura R4). Esta ablación genética también induce la activación de la proliferación compensatoria en la región posterior más alejada del SM, similar a lo encontrado en discos *GMR-hid*. Sin embargo, al inducir apoptosis con *GMR-hid* no se ha reportado una disminución de la tasa proliferativa en la región de la SOM como la que presentaron los discos *GMR-rpr*. Esta disminución del número de células proliferando que hemos encontrado en nuestros experimentos, probablemente se debe a que algunas de las células que se dividen en la SOM entran en apoptosis, ya que las células mitóticamente activas son las más susceptibles a morir en respuesta a la expresión de *rpr*. Tras el periodo de recuperación de los discos *GMR-rpr* (1 día a 17°C) el incremento de la proliferación en la región posterior al SM se mantuvo y apareció otro pico proliferativo en la región anterior al SM (Figura R5). Este incremento de la proliferación en la región anterior probablemente se debe a señales enviadas desde las células dañadas para inducir la PC en regiones muy alejadas del sitio dañado. Este tipo de señalización es un fenómeno que no se ha demostrado en otros modelos de ablación genética del ojo. En el disco imaginal de ala de *Drosophila* las células apoptóticas promueven la proliferación compensatoria a través de la secreción de los mitógenos Decapentaplegic (Dpp) y Wingless (Wg). Este proceso está bajo el control del iniciador de caspasas Dronc, pero no de las caspasas efectoras (Perez-Garijo *et al.*, 2009; Bosch *et al.*, 2008; Perez-Garijo *et al.*, 2005). En el disco de ojo se ha propuesto que existe un segundo mecanismo de proliferación compensatoria inducida por apoptósis y mediado por la señalización de Hedgehog (Hh). Además, mientras que la señalización de Dpp y Wg se emplea preferentemente en tejidos donde la proliferación se mantiene activa, la señalización de Hh puede actuar en tejidos diferenciados. Cabe resaltar que las caspasas efectoras en las neuronas fotorreceptoras estimulan la señalización de Hh y que dicha molécula es la que desencadena el reingreso del ciclo celular de aquellas células que habían salido de él (Fan y Bergmann, 2008). Estos datos coinciden con nuestros resultados, ya que nuestras observaciones indican que, al dañar la retina, se produce un incremento de la señal de *hh* en toda la región dañada. Esta señal podría promover proliferación compensatoria y además de activar otro tipo de respuestas como la que hemos descrito en esta tesis.

DISCUSIÓN.

3. Respuesta Regenerativa Glial en el disco imaginal de ojo.

Un aspecto que no había sido analizado en los estudios de daño retinal en *Drosophila* es el papel homeostático que juegan las células gliales en la recuperación del tejido nervioso que forma parte de este disco imaginal. A la reacción homeostática ante el daño del Sistema Nervioso por parte de la glía se le conoce como Respuesta Regenerativa Glial e involucra diferentes capacidades que tienen estas células para producir procesos antiinflamatorios, controlar la proliferación de células adyacentes o formar una cicatriz glial en el caso de los vertebrados (Rao y Rolls, 2017; Thompson y Tsirka, 2017; Losada-Perez *et al.*, 2016; Lemke, 2001).

Algunas de las funciones que llevan a cabo las células gliales de vertebrados como respuesta al daño de su Sistema Nervioso pueden homologarse a lo que sucede durante la RRG de *Drosophila* (Kato *et al.* 2018; Kato *et al.* 2017; Neves *et al.* 2016; Katzenberger *et al.*, 2015 y Chung *et al.* 2013). Por lo tanto, *Drosophila* es un buen sistema modelo para establecer los mecanismos que controlan la RRG, ya que existen multitud de herramientas genéticas que no están disponibles en otros sistemas modelo. En particular, en nuestro modelo de daño neuronal en el ojo se pueden analizar y cuantificar comportamientos gliales muy estereotipados que ocurren en procesos de recuperación neuronal, como son: la alteración de la proliferación y de la migración glial, y la activación de la fagocitosis. Además, nuestro modelo nos permite analizar las señales que regulan estos comportamientos a larga distancia.

Nuestros resultados indican que tras una lesión en el disco de ojos se inicia una RRG que se caracteriza por un aumento del número de células gliales que contiene el disco de ojo, y por una activación fagocítica de algunas células gliales. El incremento del número de glial se debe a dos factores, por un lado, se activa la proliferación glial, y por otro se favorece la migración glía. En esta tesis hemos utilizando diferentes abordajes para analizar cuál es la contribución de estos procesos al incremento del número de glías en respuesta al daño. Mediante el análisis de marcadores mitóticos hemos demostrado que no solamente se incrementa la tasa proliferativa de las células gliales inmediatamente después de la ablación, sino que después de 24 horas de recuperación este incremento se mantiene (Figura R7). Lo que sugiere que las señales que promueven la proliferación glial perduran por un tiempo relativamente largo una vez que ha cesado el daño. Además, bloqueando la proliferación glial en discos en los que hemos inducido ablación genética, hemos estudiado la importancia del incremento proliferativo glial en el aumento del número de glía en respuesta a una lesión. Nuestros resultados indican que la proliferación glial juega un papel fundamental en el aumento del número de glías en discos dañados, pero también sugieren que durante la inducción del daño existen señales que promueven la migración glial, ya que encontramos que en los discos dañados en los que hemos bloqueado la proliferación el número de glía se incrementa con respecto a discos en los que únicamente hemos bloqueado la proliferación glial. Esto sugiere que al dañar la región de la retina se tienen que generar señales que promuevan tanto la proliferación como la migración glial de células situadas en la región del nervio óptico, que es donde se sitúa el grupo principal de las células precursoras de las células gliales del disco de ojo (Choi y Benzer, 1994). Este tipo de respuesta ante el daño también se ha descrito en el SNC donde se observó un incremento de la proliferación del glial cuando este resulta dañado (Kato *et al.*, 2009).

Otro fenómeno que pudimos analizar fue el desplazamiento ectópico de las células gliales hacia el Límite neurogénico Anterior (LNA) (líneas punteadas en Figura R6) y hacia la parte apical de los discos con ablación genética (flecha en figura R6 H). Este efecto podría deberse a que las señales que limitan la migración anterior de las células gliales se alteran para permitir un mayor avance de estas células o podría ser ocasionada por la deformación de los discos al ser dañados. Sin embargo, el hecho de que en algunas de las condiciones que hemos analizado en esta tesis se suprima este efecto, a pesar de que los discos estén muy deformados, apoya el primer supuesto. Desconocemos si este efecto tiene importancia en el proceso de reparación, pero podría estar jugando un papel para limitar la región dañada.

Entre las principales señales que se activan en respuesta al daño que hemos identificado en nuestro estudio se encuentran las de la JNK, la de Dpp y la de Hh.

4. La vía de la JNK facilita la migración glial en respuesta al daño. embrion

La vía de la JNK es conocida por su pleiotropismo debido a que participa en procesos tan diversos como la regeneración, muerte, proliferación o migración celular (Bergantiños *et al.*, 2010; Igaki *et al.*, 2006; Bosch *et al.*, 2005; Pérez-Garijo *et al.*, 2014, Pastor-Pareja *et al.*, 2004). En el caso de las células gliales se ha visto que se activa durante la fagocitosis y durante la migración glial cuando se lleva a cabo la reparación del Sistema Nervioso Central (Pinal *et al.*, 2018 Lu *et al.*, 2017, MacDonald *et al.*, 2006). Nosotros hemos observado que la vía JNK se activa para promover la migración de las células gliales después de inducir daño en los discos de ojo. Sin embargo, la sobreexpresión de una forma constitutivamente activa de *hep* en las glías o la de Eiger en el disco de ojo no promueven la proliferación o migración ectópica de la glía (Tavares *et al.* 2017). Gracias a nuestros experimentos hemos encontrado que cuando se bloquea la vía JNK en la glía disminuye su número en la retina, pero no se altera el índice proliferativo de estas células. Lo que nos permite proponer que esta vía solo estaría participando en la facilitación de la migración glial durante la RRG, pero no en la proliferación de la glía que se activa con el daño. Una pista que cimienta la teoría sobre el papel de la ruta JNK en la migración celular la encontramos en los trabajos de Tavares *et al.* (2017) donde proponen que esta ruta es capaz de mediar una migración ectópica fuera de la región posterior del ojo por medio de la inducción de Metaloproteasas que promoverían cambios en la dinámica de microtúbulos entre las glías y el disco de ojo. Considerando todos nuestros resultados, proponemos que durante la RRG la vía de la JNK se necesita de forma permisiva para facilitar la acumulación de células gliales en la retina, pero que no es suficiente para iniciar esta migración.

En este trabajo hemos descubierto que la activación de la ruta JNK en las células gliales de discos dañados no depende de Eiger. Esta observación sugiere que la activación de esta ruta durante la RRG en el disco de ojo depende de mecanismos no canónicos. Cabe mencionar que durante el desarrollo normal existe una actividad basal de la ruta y que es clara la expresión de Eiger en células fotorreceptoras y gliales durante este periodo. Es sólo cuando se activa la maquinaria de recuperación homeostática del

DISCUSIÓN.

disco que la función de *egr* ya no es suficiente para hiperactivar a la ruta e inducir el desplazamiento glial.

Otra anomalía encontrada fue que las glías wrapping con actividad fagocítica que presentan una fuerte actividad de la JNK no hayan expresado el marcador de fagocitosis Draper, ya que durante los procesos de fagocitosis es común observar que la JNK activa a Draper para llevar a cabo este tipo tan peculiar de endocitosis (Lu *et al.*, 2017, MacDonald *et al.*, 2006). De corroborarse estos resultados conllevaría al planteamiento de una nueva respuesta fagocítica durante el daño en la retina. Un mecanismo similar ocurre durante el desarrollo embrionario de *Drosophila*, donde la inducción de apoptosis en el SNC provoca en las células gliales una respuesta fagocítica que no depende directamente de la activación del receptor Draper (Pinal *et al.*, 2018).

5. Las vías de señalización de Hh y Dpp actúan de forma sinérgica para promover la proliferación y migración glial.

Los estudios sobre el papel de la vía de Dpp en la migración glial indican que esta vía se requiere para que las células gliales migren correctamente durante el desarrollo normal del disco de ojo (Yuva-Aydemir *et al.*, 2011; Rangarajan *et al.*, 2001). Incluso existen evidencias de que esta vía podría estar controlando la proliferación glial (Tavares *et al.* 2017). Nosotros hemos comprobado que la sobreexpresión Dpp en la región neurogénica del disco de ojo puede inducir de manera no autónoma la activación de la JNK y la migración glial, pero no altera la proliferación. El grupo de Tavares *et al.* (2017) también había demostrado que la activación de Dpp en la zona diferenciada del ojo no provocaba cambios proliferativos en la glía. También encontraron al igual que nosotros que la activación autónoma de la vía en las células gliales induce su acumulación en la región basal del disco de ojo, aunque nosotros pudimos demostrar que este incremento autónomo se debe al aumento en el índice mitótico glial. Sin embargo, ninguno de estos efectos produjo un aumento similar al provocado por la ablación genética. Incluso, encontramos que la inducción simultánea del daño y la sobreexpresión de Dpp provocan un efecto sinérgico sobre la migración glial. Todas estas evidencias apuntan a que deben de existir otras señales que se activan durante la RRG y promueven cambios proliferativos y migratorios en las células gliales.

Existe una gran cantidad de estudios que demuestran la importancia de la interacción entre Dpp y Hh para controlar diversos procesos morfogénicos (Silies *et al.*, 2010, Curtiss y Mlodzik, 2000; Domínguez, 1999; Huang *et al.*, 1998; Domínguez y Hafen, 1997). En cuanto a la migración glial existe la evidencia de que ambas moléculas podrían interactuar para controlar el número de glías en la retina (Rangarajan *et al.*, 2001). No obstante, estaba poco estudiado el papel sinérgico que puedan llegar a tener estas dos moléculas difusibles durante la migración glial.

La activación ectópica de *hh* en la zona anterior del disco de ojo atrae a las células gliales provocando que superen el LNA (Rangarajan *et al.*, 2001). Cuando nosotros analizamos la sobreexpresión simultánea de *hh* y *rpr* en la región neurogénica del ojo no encontramos cambios en la proliferación o

en la migración glial. Probablemente la falta de fenotipo en estos discos se deba a que se ha reportado que Hh ejerce un efecto repelente sobre las glías durante los primeros estadios del desarrollo larvario para evitar una migración glial a destiempo (Hummel *et al.*, 2002).

La inhibición individual tanto de *hh* o como de *dpp* en los discos imaginales no alteró el número de glías o su migración en la retina. Sin embargo, cuando ambos factores fueron inhibidos simultáneamente en discos con daño pudimos observar una disminución en el número de glías y en su índice mitótico. El efecto sinérgico de ambos factores fue más claro cuando se sobreexpresaron al mismo tiempo en el disco de ojo, ya que provocaron un incremento no autónomo de la proliferación glial similar al que provoca el daño en el disco de ojo. Este efecto en el incremento proliferativo también fue superior al efecto que produce la sobreexpresión individual de *hh* y *dpp* en la retina. Hay que recalcar el efecto inhibitorio de la migración glial que produce Hh en discos tempranos, ya que la atracción motogénica que fomenta *dpp* en la glía se neutraliza cuando conjuntamente se expresa *hh*. Esto va en sintonía con los experimentos presentados por el grupo de Ragnar *et al.*, (2001), donde habían observado que clones mutantes de falta de función para *smo* y *mad* (componentes de las vías Hh y Dpp respectivamente) reducían el número de glías en una proporción mayor a la de clones individuales de estos genes mutantes. El fenotipo más acusado relacionado con el aumento en el número glial se produjo al activar de manera autónoma las vías de Hh y Dpp en las células gliales. No sólo se produjo un incremento en el ratio de glías que activan JNK a niveles altos superior al que provoca la activación individual de ambas vías. Si no que esta activación simultánea de Hh y Dpp produce un incremento en el número de glías mayor al que ocasiona la ablación genética o la activación individual de estos elementos.

Todos estos resultados sugieren que la función de ambas rutas de señalización es parcialmente redundante durante la activación de la RRG. Sin embargo, el efecto sinérgico observado al activar las dos rutas, indican que ambas señales deben de colaborar para promover la RRG. Esto podría explicar el efecto sinérgico encontrado al matar y sobreexpresar *dpp*, donde la apoptosis produciría un incremento de *hh*, que en combinación con la expresión ectópica de *dpp* podría promover una fuerte respuesta regenerativa.

6. Dpp y Hh activan a la vía JNK para promover la migración glial en el ojo.

En este trabajo hemos analizado las relaciones funcionales entre las rutas de Hh, Dpp y JNK durante la RRG. Se conoce que la vía de la JNK es capaz de activar a la de Dpp durante el cerrado dorsal en embriones, donde se requiere de un reacomodo del citoesqueleto de actina y reorganización del epitelio (Martin-Blanco *et al.*, 2000; Noselli y Agnès, 1999). En esta tesis observamos que la vía de Dpp podría activar a la de la JNK de manera paracrina desde el disco de ojo e inducir proliferación y migración glial. Esto no ocurre cuando se activa *tkv^{QD}* de manera autónoma en las células gliales. Pero cuando se co-expresa con el receptor de la vía de Hh, Ihog, se logra activar a la vía de la JNK y se incrementa la proliferación y migración glial. Lo que sugiere que la secreción de Dpp desde el disco de ojo hacia las glías podría activar a la ruta de Hh para inducir cambios en la glía y activar a la JNK.

DISCUSIÓN.

Existen indicios de una activación indirecta de la vía JNK por parte de la vía de Dpp durante procesos inflamatorios en el tejido muscular de ratones donde la TGF- β 1 es capaz de activar a la Quinasa TAK1 (de las siglas en inglés: “TGF- β -activated Kinase”) que a su vez activa a la JNK (Kim *et al.*, 2007; Hocevar *et al.*, 2005; Sakurai *et al.*, 2003). En *Drosophila* se ha demostrado que la TAK1 es capaz de activar a la vía JNK al nivel de la Quinasa Bsk, esto sugiere que, durante la inducción de la muerte, la vía de Dpp podría activar a la vía de la JNK de forma independiente a la función de Eiger (Kim *et al.*, 2007; Takatsu *et al.*, 2000).

Nuestros resultados indican que al bloquear la ruta de la JNK en condiciones en las que activamos tanto a *hh* como a *dpp* se suprime parcialmente el incremento de células gliales ocasionado por la activación de ambas rutas de señalización. Esta reducción no se debe a que un efecto en la proliferación, ya que el índice de proliferación glial en estas condiciones mutantes es similar al encontrado al sobreexpresar ambas rutas. Esto sugiere que la ruta de la JNK estaría favoreciendo que tras la activación de ambas rutas se incrementara la migración glial.

7. Modelo de RRG en el disco de ojo

En vista de los resultados obtenidos en esta tesis proponemos el siguiente modelo acerca de cómo se regula la respuesta regenerativa glial en el disco de ojo. Tras la inducción de un daño en la región de la retina se activarían las rutas de JNK, Hh y Dpp. Esta activación sería de forma independiente, ya que como hemos descrito la eliminación de la actividad de JNK no es suficiente para bloquear la activación ectópica ni de *dpp* ni de *hh* que observamos en discos dañados. Además, al bloquear la ruta de Dpp con *brk* tampoco se altera el incremento de la ruta de JNK. En el caso de HH se ha descrito que en el disco de ojo su expresión ectópica tras la inducción de apoptosis esta mediada por las caspasas efectoras, ya que, el inhibidor P35 bloquea el aumento de la expresión de la actividad de *hh* en discos dañados (Fan y Bergmann, 2008). Es posible que la activación de las rutas tanto de Dpp como de JNK pudieran estar reguladas de una forma similar.

La activación de *dpp* y *hh* en la región dañada, promovería de forma paracrina la activación de ambas rutas en las células gliales. En estas células ambas rutas colaborarían para promover la actividad de la JNK, cuya función sería fundamental para facilitar la movilidad celular y así incrementar la migración de las células gliales, esto podría ser gracias al incremento de la actividad de metaloproteasas descrito por (Tavares *et al.*, 2017). Es posible que el incremento de *dpp* y *hh* en la región dañada sirvan como referencias para promover la migración glial hacia las regiones con niveles más altos de estos factores, ya que se ha publicado que las células gliales tienden a dirigirse a clones de células que expresan altos niveles de *hh* (Ragnar *et al.*, 2001). En las células gliales el incremento de la ruta de la JNK, no estaría involucrada en el aumento de la proliferación de estas células. Nuestros resultados indican que es la acción conjunta de las rutas de Dpp y Hh la que estaría promoviendo la actividad mitótica de las células gliales (Figura D1)

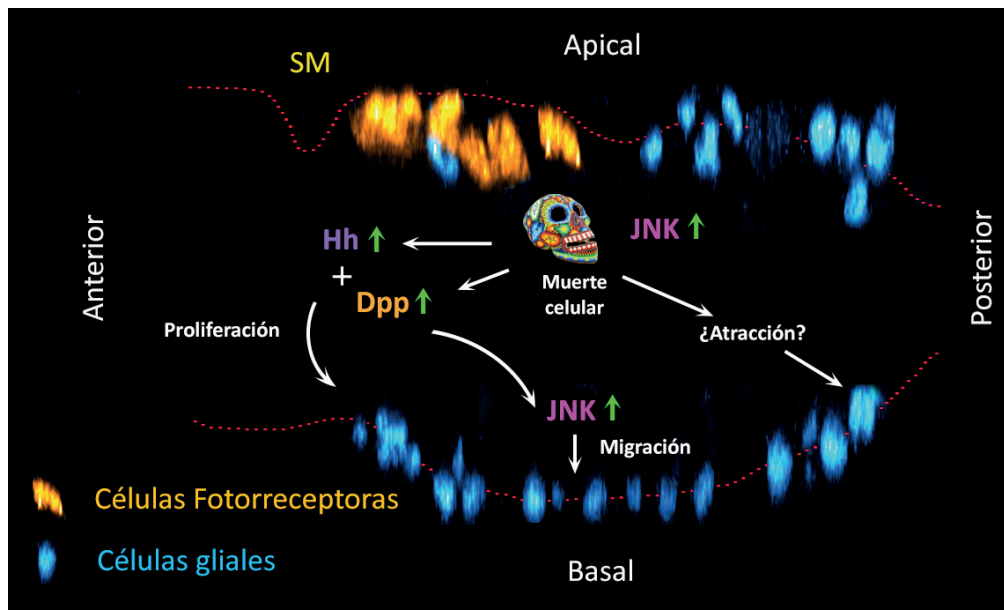


Figura D1. Modelo de Respuesta del disco de ojo frente a la ablación genética. El daño promueve una respuesta regenerativa glial que consiste en un incremento de la migración, y división glial. Las vías de señalización de Hh, Dpp y JNK están mediando este tipo de respuesta. Las vías de Hh y Dpp promueven simultáneamente la inducción de la proliferación glial en la retina y para activar a la ruta JNK que facilita la migración glial. Además, como consecuencia de la muerte la vía de la JNK se activa en las células del disco de ojo. Existen evidencias de que otras rutas podrían estar mediando este tipo de atracción glial hacia la zona de la herida.

Algunas expectativas a futuro en las que se debería indagar pasan por el análisis de los efectos de las vías del EGFR, FGF y de JAK/STAT ya que aparte de que juegan un papel muy importante durante la activación de la fagocitosis en la glía, contamos con resultados preliminares que nos muestran que estas vías están alteradas durante la RRG como consecuencia del daño al disco de ojo.

CONSLUSIONES

1. Los discos imaginales de ojo tienen la capacidad para reestablecer su tamaño y estructura cuando la región de la retina, constituida por fotorreceptores y células accesorias, es dañada en etapas tempranas del tercer estadio larvario.
2. La capacidad homeostática de los discos declina durante el desarrollo, de manera que, los discos no pueden recuperarse cuando se inducen daños en estadios tardíos del desarrollo larvario.
3. La inducción de daño en la región de la retina estimula la proliferación de las células circundantes a la herida.
4. La inducción de apoptosis en la región retinal del disco activa la Respuesta Regenerativa Glial (RRG), caracterizada por una acumulación de células gliales como consecuencia de un incremento en la proliferación y migración glial.
5. Los daños en la región de la retina promueven la actividad fagocítica de algunas células gliales.
6. La activación de la ruta de señalización de la JNK, tanto en las células gliales, como en la región dañada es necesaria para promover la migración de las células gliales.
7. La activación de la ruta de señalización de Dpp en las células gliales es esencial para promover la proliferación y migración glial durante la RRG.
8. La función de las rutas de Dpp y de Hh funcionan de manera redundante para promover la RRG desde las células retinales dañadas.
9. La activación simultánea de las rutas de señalización de Hh y Dpp en las células de la retina promueven la proliferación y migración de las células gliales.
10. Las rutas de Dpp y Hh actúan de forma sinérgica para inducir la proliferación de las células gliales y para activar a la ruta de la JNK en estas mismas células.
11. El incremento de la migración glial causado por la activación simultánea de las rutas de señalización de Hh y Dpp es mediado por la ruta de señalización de JNK.



BIBLIOGRAFÍA

- Adams, L. C., Celniker, S. E., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E, Li, P. W., Hosking, R. A., Galle, R. F., Venter, J. C. *et al.*** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. **287**: 2185-2195.
- Agata, K., Saito, Y., Nakajima, E.** (2007). Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. *Dev. Growth Differ.* **49**(29): 73-78.
- Alcolado, R., Weller, R. O., Parrish, E. P., Garrod, D.** (1988). The cranial arachnoid and pia mater in man: anatomical and ultrastructural observations. *Neuropathol Appl Neurobiol.* **14**(1): 1-17.
- Altenhein, B., Cattenoz, P.B., Giangrande, A.** (2016). The early life of a fly glial cell. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **5**, 67–84.
- Ambrosini, A., Gracia, M., Proag, A., Rayer, M., Monier, B., Suzanne, M.** (2017). Apoptotic forces in tissue morphogenesis. *Mech. Dev.* **144**(A): 33-42.
- Auld, V. J., Fetter, R. D., Broadie, K., Goodman, C. S.** (1995). Gliotactin, a novel trans-membrane protein on peripheral glia, is required to form the blood-nerve barrier in *Drosophila*. *Cell*. **81**: 757-767.
- Awasaki T., Lai, S., Ito, K., Lee, T.** (2008). Organization and Postembryonic Development of Glial Cells in the Adult Central Brain of *Drosophila*. *J. Neurosci.* **28**(51): 13742–13753.
- Ayaz, D., Leyssen, M., Koch, M., Yan, J., Srahna, M., Sheeba, V., Fogle, K.J., Holmes, T.C., Hassan, B.A.** (2008). Axonal injury and regeneration in the adult brain of *Drosophila*. *J. Neurosci.* **28**, 6010–6021.
- Azevedo, F. A., Carvalho, L. R., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E., Leite, R. E., *et al.*** (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.* **513**: 532–541.
- Bach, E.A., Ekas, L.A., Ayala-Camargo, A., Flaherty, M.S., Lee, H., Perrimon, N., Baeg, G.-H.** (2007). GFP reporters detect the activation of the *Drosophila* JAK/STAT pathway in vivo. *Gene Expr. Patterns* **7**, 323–331.
- Baker, N.E., Yu, S.Y.** (2001). The EGF receptor defines domains of cell cycle progression and survival to regulate cell number in the developing *Drosophila* eye. *Cell* **104**, 699–708.
- Banerjee, S., Bhat, M. A.** (2008). Glial ensheathment of peripheral axons in *Drosophila*. *J. Neurosci. Res.* **86**: 1189-1198.
- Bangs, P., White, K.** (2000). Regulation and execution of apoptosis during *Drosophila* development. *Dev. Dyn.* **218**, 68–79.

BIBLIOGRAFÍA.

- Baonza, A., Freeman, M.** (2001). Notch signalling and the initiation of neural development in the *Drosophila* eye. *Development*. **128**: 3889-3898.
- Baonza, A., Freeman, M.** (2005). Control of cell proliferation in the *Drosophila* eye by Notch signaling. *Dev. Cell*. **8**: 529-539.
- Baonza, A., Murawsky, C.M., Travers, A.A., Freeman, M.** (2002). Pointed and Tramtrack69 establish an EGFR-dependent transcriptional switch to regulate mitosis. *Nature Cell Biology* **4**(12), pp. 976–980.
- Bate, M., Martinez-Arias, A.** (1993). *The Development of Drosophila melanogaster*. 1a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1564 pp.
- Beira, J. V., Paro, R.** (2016). The legacy of *Drosophila* imaginal discs. *Chromosoma*. **125**(4): 573-592.
- Bergantiños, C., Corominas, M., Serras, F.** (2010). Cell death-induced regeneration in wing imaginal discs requires JNK signalling. *Development* **137**(7), pp. 1169–1179.
- Bergantiños, C., Vilana, X., Corominas, M., Serras, F.** (2010). Imaginal discs: Renaissance of a model for regenerative biology. *Bioessays*. **32**(3): 201-217.
- Bergmann, A., Tugentman, M., Shilo, B.Z., Steller, H.** (2002). Regulation of cell number by MAPK-dependent control of apoptosis: a mechanism for trophic survival signaling. *Dev. Cell* **2**, 159–170.
- Betz, A., Ryoo, H.D., Steller, H., Darnell, J.E.** (2008). STAT92E is a positive regulator of *Drosophila* inhibitor of apoptosis 1 (DIAP/1) and protects against radiation-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 13805–13810.
- Bodenstein, D.** (1943). Hormones and tissue competence in the development of *Drosophila*. *The Biol. Bull.* **84**(1): 34-58.
- Borst, A.** (2014). Fly visual course control: behaviour, algorithms and circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**(9): 590–599.
- Borst, A., Helmstaedter, M.** (2015). Common circuit design in fly and mammalian motion vision. *Nat. Neurosci.* **18**(8): 1067–1076.
- Bosch, M., Baguna, J., Serras, F.** (2008). Origin and proliferation of blastema cells during regeneration of *Drosophila* wing imaginal discs. *Int. J. Dev. Biol.* **52**(8): 1043-1050.
- Bosch, M., Serras, F., Martín-Blanco, E., Baguñà, J.** (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. *Developmental Biology* **280**(1), pp. 73–86.

- Brookes, J. P., Kumar, A.** (2008). Comparative aspects of animal regeneration. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **24**: 525-549.
- Bryant, P. J.** (1971). Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **26**(4): 637-651.
- Bryant, S. V., French, V. Bryant, P. J.** (1981). Distal regeneration and simmetry. *Science*. **212** (4498): 993-1002.
- Cagan, R.** (2009). Principles of *Drosophila* eye differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* **89**: 115-135.
- Campbell, G., Tomlinson, A.** (1999). Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of *Drosophila*: regulation of Dpp targets by brinker. *Cell* **96**, 553–562.
- Cho, S., Park, E.M., Kim, Y., Liu, N., Gal, J., Volpe, B.T., Joh, T.H.** (2001). Early c-Fos induction after cerebral ischemia: a possible neuroprotective role. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **21**, 550–556.
- Choi, K.W., Benzer, S.** (1994). Migration of glia along photoreceptor axons in the developing *Drosophila* eye. *Neuron* **12**, 423–431.
- Christiansen, A.E., Ding, T., Bergmann, A.** (2012). Ligand-independent activation of the Hedgehog pathway displays non-cell autonomous proliferation during eye development in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **129**, 98–108.
- Christiansen, A.E., Ding, T., Fan, Y., Graves, H.K., Herz, H.M., Lindblad, J.L., Bergmann, A.** (2013). Non-cell autonomous control of apoptosis by ligand-independent Hedgehog signaling in *Drosophila*. *Cell Death Differ.* **20**, 302–311.
- Chung, W.-S., Clarke, L.E., Wang, G.X., Stafford, B.K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L.C., Thompson, A., Chen, C., *et al.*** (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature* **504**, 394–400.
- Correa-Cerro, L.S., Mandell, J.W.** (2007). Molecular mechanisms of astrogliosis: new approaches with mouse genetics. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **66**, 169–176.
- Cregg, J.M., DePaul, M.A., Filous, A.R., Lang, B.T., Tran, A., Silver, J.** (2014). Functional regeneration beyond the glial scar. *Exp. Neurol.* **253**, 197–207.
- Crews, S.T.** (1998). Controls of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins. *Genes and Dev.* **12**: 607-620.
- Curtiss, J., Mlodzik, M.** (2000). Morphogenetic furrow initiation and progression during eye development in *Drosophila*: the roles of decapentaplegic, hedgehog and eyes absent. *Development* **127**, 1325–1336.



BIBLIOGRAFÍA.

- Davis, T. L. Rebay, L.** (2017). Master regulators in development: Views from the *Drosophila* retinal termination and mammalian pluripotency gene networks. *Dev. Biol.* **412**(2): 93-107.
- Dearborn, R., Kunes, S.** (2004). An axon scaffold induced by retinal axons directs glia to destinations in the *Drosophila* optic lobe. *Development* **131**, 2291–2303.
- Diaz-Garcia, S., Ahmed, S., Baonza, A.** (2016). Analysis of the Function of Apoptosis during Imaginal Wing Disc Regeneration in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **11**, e0165554.
- Doherty, J., Logan, M. A., Tasdemir, O. E., Freeman, M. R.** (2009). Ensheathing glia function as phagocytes in the adult *Drosophila* brain. *J. Neurosci.* **29**: 4768-4781.
- Doherty, J., Sheehan, A.E., Bradshaw, R., Fox, A.N., Lu, T.-Y., Freeman, M.R.** (2014). PI3K signaling and Stat92E converge to modulate glial responsiveness to axonal injury. *PLoS Biol.* **12**, e1001985.
- Domínguez, M.** (1999). Dual role for Hedgehog in the regulation of the proneural gene *atonal* during ommatidia development. *Development* **126**, 2345–2353.
- Dominguez, M., de Celis, J. F.** (1998). A dorsal/ventral boundary established by Notch controls growth and polarity in the *Drosophila* eye. *Nature*. **396**:276-278
- Domínguez, M., Hafen, E.** (1997). Hedgehog directly controls initiation and propagation of retinal differentiation in the *Drosophila* eye. *Genes & Development* **11**(23), pp. 3254–3264.
- Duong, H., Wang, C. W., Sun, Y. H., Courey, A. J.** (2008). Transformation of eye to antenna by misexpression of a single gene. *Mech. Dev.* **125**: 130-141.
- Ekas, L. A., Baeg, G. H., Flaherty, M. S., Ayala-Camargo, A., Bach, E. A.** (2006). JAK/STAT signaling promotes regional specification by negatively regulating wingless expression in *Drosophila*. *Development*. **133**: 4721-4729.
- Fan, Y., Bergmann, A.** (2008). Distinct mechanisms of apoptosis-induced compensatory proliferation in proliferating and differentiating tissues in the *Drosophila* eye. *Dev. Cell* **14**, 399–410.
- Fan, Y., Bergmann, A.** (2014). Multiple mechanisms modulate distinct cellular susceptibilities toward apoptosis in the developing *Drosophila* eye. *Dev. Cell* **30**, 48–60.
- Fang, Y., Soares, L., Teng, X., Geary, M., Bonini, N.M.** (2012). A novel *Drosophila* model of nerve injury reveals an essential role of *Nmnat* in maintaining axonal integrity. *Curr. Biol.* **22**, 590–595.
- Fernandes, V.M., Chen, Z., Rossi, A.M., Zipfel, J., Desplan, C.** (2017). Glia relay differentiation cues to coordinate neuronal development in *Drosophila*. *Science* **357**, 886–891.
- Firth, L.C., Baker, N.E.** (2007). Spitz from the retina regulates genes transcribed in the second mitotic

wave, peripodial epithelium, glia and plasmatocytes of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Dev. Biol.* **307**, 521–538.

Franzdóttir, S.R., Engelen, D., Yuva-Aydemir, Y., Schmidt, I., Aho, A., Klämbt, C. (2009). Switch in FGF signalling initiates glial differentiation in the *Drosophila* eye. *Nature* **460**, 758–761.

Freeman, M. (1994). The *spitz* gene is required for photoreceptor determination in the *Drosophila* eye where it interacts with the EGF receptor. *Mech. Dev.* **48**, 25–33.

Freeman, M. R., (2015). *Drosophila* Central Nervous System Glia. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**: 1-14.

Freeman, M.R., Delrow, J., Kim, J., Johnson, E., and Doe, C.Q. (2003). Unwrapping glial biology: *Gcm* target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron* **38**, 567–580.

Fu, W., Baker, N. E. (2003). Deciphering synergistic and redundant roles of Hedgehog, Decapentaplegic and Delta that drive the wave of differentiation in *Drosophila* eye development. *Development.* **130**: 5229-5239.

Garcia-Bellido, A., Merriam, J. R. (1969). Cell lineage of the imaginal discs in *Drosophila* gynandromorphs. *J. Exp. Zool.* **170**: 61–75.

Garratt, A.N., Voiculescu, O., Topilko, P., Charnay, P., Birchmeier, C. (2000). A dual role of *erbB2* in myelination and in expansion of the schwann cell precursor pool. *J. Cell Biol.* **148**, 1035–1046.

Gaudet, A.D., Fonken, L.K. (2018). Glial cells shape pathology and repair after spinal cord injury. *Neurotherapeutics* **15**, 554–577.

Geuking, P., Narasimamurthy, R., Lemaitre, B., Basler, K., Leulier, F. (2009). A non-redundant role for *Drosophila* *Mkk4* and hemipterous/*Mkk7* in TAK1-mediated activation of JNK. *PLoS ONE* **4**, e7709.

Glise, B., Bourbon, H., Noselli, S. (1995). *hemipterous* encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* **83**, 451–461.

Greenwood, S., Struhl, G. (1999). Progression of the morphogenetic furrow in the *Drosophila* eye: the roles of Hedgehog, Decapentaplegic and the Raf pathway. *Development.* **126**: 5795-5808.

Griffiths, R.C., Benito-Sipos, J., Fenton, J.C., Torroja, L., Hidalgo, A. (2007). Two distinct mechanisms segregate Prospero in the longitudinal glia underlying the timing of interactions with axons. *Neuron Glia Biol.* **3**, 75–88.

Griffiths, R.L., and Hidalgo, A. (2004). Prospero maintains the mitotic potential of glial precursors enabling them to respond to neurons. *EMBO J.* **23**, 2440–2450.



BIBLIOGRAFÍA.

- Hadorn, E., Anders, G., Ursprung, H.** (1959). Combination derived from partial dissociated imaginal disks of various mutants and types of *Drosophila*. *J. Exp. Zool.* **142**: 159-69.
- Hafezi, F., Steinbach, J.P., Marti, A., Munz, K., Wang, Z.Q., Wagner, E.F., Aguzzi, A., Remé, C.E.** (1997). The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. *Nat. Med.* **3**, 346-349.
- Halder, G., Callaerts, P., Gehring, W.J.** (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* **267**(5205), pp. 1788-1792.
- Hamaratoglu, F., Affolter, M., Pyrowolakis, G.** (2014). Dpp/BMP signaling in flies: from molecules to biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **32**, 128-136.
- Hariharan, I.K., Serras, F.** (2017). Imaginal disc regeneration takes flight. *Curr. Opin. Cell Biol.* **48**, 10-16.
- Hays, R., Wickline, L., Cagan, R.** (2002). Morgue mediates apoptosis in the *Drosophila melanogaster* retina by promoting degradation of DIAP1. *Nat. Cell Biol.* **4**, 425-431.
- Heberlein, U., Wolff, T., Rubin, G. M.** (1993). The TGF beta homolog dpp and the segment polarity gene hedgehog are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell.* **75**: 913-926.
- Helfrich-Förster, C., Edwards, T., Yasuyama, K., Wisotzki, B., Schneuwly, S., Stanewsky, R., Meinertzhagen, I. A., Hofbauer, A.** (2002). The extraretinal eyelet of *drosophila*: development, ultra-structure, and putative circadian function. *J. Neurosci.* **22**(21): 9255-9266.
- Herculano-Houzel, S.** (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia.* **62**: 1377-1391.
- Hocevar, B.A., Prunier, C., Howe, P.H.** (2005). Disabled-2 (Dab2) mediates transforming growth factor beta (TGFbeta)-stimulated fibronectin synthesis through TGFbeta-activated kinase 1 and activation of the JNK pathway. *J. Biol. Chem.* **280**, 25920-25927.
- Holland, P. W.** (1999). The future of evolutionary developmental biology. *Nature.* **402**: C41-C44.
- Hooper, J.E., Scott, M.P.** (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 306-317.
- Horiuchi, D., Collins, C.A., Bhat, P., Barkus, R.V., Diantonio, A., Saxton, W.M.** (2007). Control of a kine-sin-cargo linkage mechanism by JNK pathway kinases. *Curr. Biol.* **17**, 1313-1317.
- Huang, Z., Kunes, S.** (1996). Hedgehog, transmitted along retinal axons, triggers neurogenesis in the developing visual centers of the *Drosophila* brain. *Cell* **86**, 411-422.
- Huang, Z., Shilo, B., Kunes, S.** (1998). A Retinal Axon Fascicle Uses Spitz, an EGF Receptor Ligand, to

Construct a Synaptic Cartridge in the Brain of *Drosophila*. *Cell*. **95**: 693–703.

Hummel, T., Attix, S., Gunning, D., Zipursky, S.L. (2002). Temporal control of glial cell migration in the *Drosophila* eye requires *gilgamesh*, *hedgehog*, and eye specification genes. *Neuron* **33**, 193–203.

Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., Miura, M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J.* **21**, 3009–3018.

Igaki, T., Pagliarini, R.A. and Xu, T. (2006). Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*. *Current Biology* **16**(11), pp. 1139–1146.

Ingham, P.W., Nakano, Y., Seger, C. (2011). Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 393–406.

Ito, K., Urban, J., Technau, G. M. (1995). Distribution, classification and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Roux. Arch. Dev. Biol.* **204**(5): 284–307.

Jäkel, S., Dimou, L. (2017). Glial cells and their function in the adult brain: A journey through the history of their ablation. *Front. Cell. Neurosci.* **11**(24): 1–17.

Jamieson, J. J., Searson, P. C., Gerecht, S. (2017). Engineering the human blood-brain barrier in vitro. *J. Biol. Eng.* **11** (37): 1–11.

Jaźwińska, A., Kirov, N., Wieschaus, E., Roth, S., Rushlow, C. (1999). The *Drosophila* gene *brinker* reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell* **96**, 563–573.

Kaiser, D. (2001). Building a multicellular organism. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 103–123.

Kato, K., Awasaki, T., Ito, K. (2009). Neuronal programmed cell death induces glial cell division in the adult *Drosophila* brain. *Development* **136**, 51–59.

Kato, K., Forero, M.G., Fenton, J.C., Hidalgo, A. (2011). The glial regenerative response to central nervous system injury is enabled by *pros-notch* and *pros-NFκB* feedback. *PLoS Biol.* **9**, e1001133.

Kato, K., Losada-Perez, M., Hidalgo, A. (2018). Gene network underlying the glial regenerative response to central nervous system injury. *Dev. Dyn.* **247**, 85–93.

Katzenberger, R.J., Chtarbanova, S., Rimkus, S.A., Fischer, J.A., Kaur, G., Seppala, J.M., Swanson, L.C., Zajac, J.E., Ganetzky, B., Wassarman, D.A. (2015). Death following traumatic brain injury in *Drosophila* is associated with intestinal barrier dysfunction. *Elife* **4**.

Kawamoto, Y., Nakajima, Y., Kuranaga, E. (2016). Apoptosis in cellular society: communication between apoptotic cells and their neighbors. *Int. J. Mol. Sci.* **17**(12):1–15.

BIBLIOGRAFÍA.

- Kenyon, K. L., Ranade, S. S., Curtiss, J., Mlodzik, M., Pignoni, F.** (2003). Coordinating proliferation and tissue specification to promote regional identity in the *Drosophila* head. *Dev. Cell.* **5**(3): 403-414.
- Kim, S.I., Kwak, J.H., Zachariah, M., He, Y., Wang, L., Choi, M.E.** (2007). TGF-beta-activated kinase 1 and TAK1-binding protein 1 cooperate to mediate TGF-beta1-induced MKK3-p38 MAPK activation and stimulation of type I collagen. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **292**, F1471-8.
- Klämbt, C.** (2009). Modes and regulation of glial migration in vertebrates and invertebrates. *Nature Rev. Neuroscience.* **10**: 769-779.
- Klinedinst, S., Wang, X., Xiong, X., Haenfler, J.M., Collins, C.A.** (2013). Independent pathways downstream of the Wnd/DLK MAPKKK regulate synaptic structure, axonal transport, and injury signaling. *J. Neurosci.* **33**, 12764–12778.
- Lawrence, P. A.** (1992). *The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design.* 1a ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 228p.
- Lebovitz, R.M., Ready, D.F.** (1986). Ommatidial development in *Drosophila* eye disc fragments. *Dev. Biol.* **117**, 663–671.
- Lee, R.T.H., Zhao, Z., Ingham, P.W.** (2016). Hedgehog signalling. *Development* **143**, 367–372.
- Lemke, G.** (2001). Glial control of neuronal development. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 87-105.
- Lesch, C., Jo, J., Wu, Y., Fish, G. S., Galko, M. J.** (2010). A targeted *UAS*-RNAi screen in *Drosophila* larvae identifies wound closure genes regulating distinct cellular processes. *Genetics.* **186**: 943–57.
- Losada-Perez, M., Harrison, N., Hidalgo, A.** (2016). Molecular mechanism of central nervous system repair by the *Drosophila* NG2 homologue kon-tiki. *J. Cell Biol.* **214**, 587–601.
- Lu, T.-Y., MacDonald, J.M., Neukomm, L.J., Sheehan, A.E., Bradshaw, R., Logan, M.A., Freeman, M.R.** (2017). Axon degeneration induces glial responses through Draper-TRAF4-JNK signalling. *Nat. Commun.* **8**, 14355.
- Ma, X., Huang, J., Yang, L., Yang, Y., Li, W., Xue, L.** (2012). NOPO modulates Egr-induced JNK-independent cell death in *Drosophila*. *Cell Res.* **22**, 425–431.
- MacDonald, J.M., Beach, M.G., Porpiglia, E., Sheehan, A.E., Watts, R.J., Freeman, M.R.** (2006). The *Drosophila* cell corpse engulfment receptor Draper mediates glial clearance of severed axons. *Neuron* **50**, 869–881.
- Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M., Martinez-Arias, A.** (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev.* **12**: 557–570.

- Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J.C., Garcia-Bellido, A.** (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 7888–7893.
- Massaro, C.M., Pielage, J., Davis, G.W.** (2009). Molecular mechanisms that enhance synapse stability despite persistent disruption of the spectrin/ankyrin/microtubule cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **187**, 101–117.
- Matthijs, R., Kooistra, H., Dubé, N., Bos, J. L.** (2007). Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J. Cell Sci.* **120**: 17-22.
- Matzat, T., Sieglitz, F., Kottmeier, R., Babatz, F., Engelen, D., Klämbt, C.** (2015). Axonal wrapping in the *Drosophila* PNS is controlled by glia-derived neuregulin homolog Vein. *Development.* **142**: 1336-1345.
- Meserve, J.H., Duronio, R.J.** (2017). A population of G2-arrested cells are selected as sensory organ precursors for the interommatidial bristles of the *Drosophila* eye. *Dev. Biol.* **430**, 374–384.
- Meserve, J.H., Duronio, R.J.** (2018). Fate mapping during regeneration: Cells that undergo compensatory proliferation in damaged *Drosophila* eye imaginal discs differentiate into multiple retinal accessory cell types. *Dev. Biol.* **444**, 43–49.
- Michailov, G.V., Sereda, M.W., Brinkmann, B.G., Fischer, T.M., Haug, B., Birchmeier, C., Role, L., Lai, C., Schwab, M.H., Nave, K.-A.** (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* **304**, 700–703.
- Mukherjee, T., Choi, I., Banerjee, U.** (2012). Genetic analysis of fibroblast growth factor signaling in the *Drosophila* eye. *G3 (Bethesda)* **2**, 23–28.
- Nedelcu, A. M.** (2012). The evolution of self during the transition to multicellularity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **738**: 14-30.
- Nériec, N. Desplan, C.** (2016). From the eye to the brain: Development of the *Drosophila* visual system. *Curr. Top. Dev. Biol.* **116**: 247–271.
- Neves, J., Zhu, J., Sousa-Victor, P., Konjikusic, M., Riley, R., Chew, S., Qi, Y., Jasper, H., Lamba, D.A.** (2016). Immune modulation by MANF promotes tissue repair and regenerative success in the retina. *Science* **353**.
- Noselli, S., Agnès, F.** (1999). Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9**, 466–472.
- Nüsslein-Volhard C.** (2006). *Coming to Life: How Genes Drive Development*. Yale University Press. 181p.

BIBLIOGRAFÍA.

- Olson, M.R., Holley, C.L., Gan, E.C., Colón-Ramos, D.A., Kaplan, B., Kornbluth, S.** (2003b). A GH3-like domain in reaper is required for mitochondrial localization and induction of IAP degradation. *J. Biol. Chem.* **278**, 44758–44768.
- Olson, M.R., Holley, C.L., Yoo, S.J., Huh, J.R., Hay, B.A., Kornbluth, S.** (2003a). Reaper is regulated by IAP-mediated ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **278**, 4028–4034.
- Omoto, J. J., Lovick, J. K., Hartenstein, V.** (2016). Origins of glial cell populations in the insect nervous system. *Curr. Opin. Insect. Sci.* **18**: 96-104.
- Padgett, R.W., St Johnston, R.D., Gelbart, W.M.** (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* **325**, 81–84.
- Pannicke, T., Ivo Chao, T., Reisenhofer, M., Francke, M. and Reichenbach, A.** (2017). Comparative electrophysiology of retinal Müller glial cells—A survey on vertebrate species. *Glia*. **65**: 533–568.
- Pastor-Pareja, J.C., Grawe, F., Martín-Blanco, E., García-Bellido, A.** (2004). Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Developmental Cell* **7**(3), pp. 387–399.
- Pereanu, W., Shy, D., Hartenstein, V.** (2005). Morphogenesis and proliferation of the larval brain glia in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **283**(1): 191-203.
- Pérez-Garijo, A., Martín, F.A., Morata, G.** (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* **131**(22), pp. 5591–5598.
- Pérez-Garijo, A., Martín, F.A., Struhl, G., Morata, G.** (2005). Dpp signaling and the induction of neoplastic tumors by caspase-inhibited apoptotic cells in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(49), pp. 17664–17669.
- Pérez-Garijo, A., Shlevkov, E., Morata, G.** (2009). The role of Dpp and Wg in compensatory proliferation and in the formation of hyperplastic overgrowths caused by apoptotic cells in the *Drosophila* wing disc. *Development* **136**(7), pp. 1169–1177.
- Pinal, N., Calleja, M., Morata, G.** (2019). Pro-apoptotic and pro-proliferation functions of the JNK pathway of *Drosophila*: roles in cell competition, tumorigenesis and regeneration. *Open biology* **9**(3), p. 180256.
- Pinal, N., Martín, M., Medina, I., Morata, G.** (2018). Short-term activation of the Jun N-terminal kinase pathway in apoptosis-deficient cells of *Drosophila* induces tumorigenesis. *Nature Communications* **9**(1), p. 1541.
- Pinto-Teixeira, F., Konstantinides, N., Desplan, C.** (2016). Programmed cell death acts at different stages of *Drosophila* neurodevelopment to shape the central nervous system. *FEBS Lett.* **590**(15):

2435-2453.

- Potter, C.J., Tasic, B., Russler, E.V., Liang, L., Luo, L.** (2010). The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell* **141**, 536–548.
- Rangarajan, R., Courvoisier, H., Gaul, U.** (2001). Dpp and Hedgehog mediate neuron-glia interactions in *Drosophila* eye development by promoting the proliferation and motility of subretinal glia. *Mech. Dev.* **108**, 93–103.
- Rangarajan, R., Gong, Q., Gaul, U.** (1999). Migration and function of glia in the developing *Drosophila* eye. *Development* **126**, 3285–3292.
- Rao, K. S., Rolls, M. M.** (2017). Two *Drosophila* model neurons can regenerate axons from the stump or from a converted dendrite, with feedback between the two sites. **12**: 1-11.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., Bier, E.** (2001). A systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **11**(6): 1114-1125.
- Repiso, A., Bergantinos, C., Serras, F.** (2013). Cell fate respecification and cell division orientation drive intercalary regeneration in *Drosophila* wing discs. *Development*. **140**(17): 3541-3551.
- Ronaldson, P. T., Davis, T. P.** (2012). Blood-brain barrier integrity and glial support: Mechanism that can be targeted for novel therapeutic approaches in stroke. *Curr. Pharm. Des.* **18**(25): 3624-3644.
- Ryoo, H.D., Gorenc, T., Steller, H.** (2004). Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Developmental Cell* **7**(4), pp. 491–501.
- Sandu, C., Ryoo, H.D., Steller, H.** (2010). *Drosophila* IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death. *J. Cell Biol.* **190**, 1039–1052.
- Sasse, S., Neuert, H., Klämbt, C.** (2015). Differentiation of *Drosophila* glial cells. *WIREs Dev. Biol.* **4**: 623-636.
- Sato, M., Suzuki, T., Nakai, Y.** (2013). Waves of differentiation in the fly visual system. *Dev. Biol.* **380**(1): 1-11.
- Saura, C.A., Choi, S.-Y., Beglopoulos, V., Malkani, S., Zhang, D., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., Kelleher, R.J., Kandel, E.R., Duff, K., *et al.*** (2004). Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron* **42**, 23–36.
- Scholz, H., Sadlowski, E., Klaes, A., Klämbt, C.** (1997). Control of midline glia development in the embryonic *Drosophila* CNS. *Mech. Dev.* **64**, 137–151.



BIBLIOGRAFÍA.

- Shen, J., and Dahmann, C.** (2005). The role of Dpp signaling in maintaining the *Drosophila* anteroposterior compartment boundary. *Dev. Biol.* **279**, 31–43.
- Shin, K., Lee, J., Guo, N., Kim, J., Lim, A., Qu, L., Mysorekar, I.U., Beachy, P.A.** (2011). Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature* **472**, 110–114.
- Sieglitz, F., Matzat, T., Yuva-Aydemir, Y., Neuert, H., Altenhein, B., Klämbt, C.** (2013). Antagonistic feedback loops involving Rau and Sprouty in the *Drosophila* eye control neuronal and glial differentiation. *Sci. Signal.* **6**, ra96.
- Silies, M., Yuva, Y., Engelen, D., Aho, A., Stork, T., Klämbt, C.** (2007). Glial cell migration in the eye disc. *J. Neurosci.* **27**(48): 13130–13139.
- Silies, M., Yuva-Aydemir, Y., Franzdóttir, S. R., Klämbt, C.** (2010). The eye imaginal disc as a model to study the coordination of neuronal and glial development. *Fly.* **4**: 71–79.
- Silver, J., and Miller, J.H.** (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 146–156.
- Smith-Bolton, R.K., Worley, M.I., Kanda, H., Hariharan, I.K.** (2009). Regenerative growth in *Drosophila* imaginal discs is regulated by Wingless and Myc. *Developmental Cell* **16**(6), pp. 797–809.
- Soares, L., Parisi, M., Bonini, N.M.** (2014). Axon injury and regeneration in the adult *Drosophila*. *Sci. Rep.* **4**, 6199.
- Sofroniew, M. V.** (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends. Neurosci.* **32**: 638–647.
- Song, Y., Ori-McKenney, K.M., Zheng, Y., Han, C., Jan, L.Y., Jan, Y.N.** (2012). Regeneration of *Drosophila* sensory neuron axons and dendrites is regulated by the Akt pathway involving Pten and microRNA bantam. *Genes Dev.* **26**, 1612–1625.
- Spindler, S. R., Ortiz, I., Fung, S., Takashima, S., Hartenstein, V.** (2009). *Drosophila* cortex and neuropile glia influence secondary axon tract growth, pathfinding, and fasciculation in the developing larval brain. *Dev. Biol.* **334**(2): 355–368.
- Stone, M.C., Nguyen, M.M., Tao, J., Allender, D.L., Rolls, M.M.** (2010). Global up-regulation of microtubule dynamics and polarity reversal during regeneration of an axon from a dendrite. *Mol. Biol. Cell* **21**, 767–777.
- Stork, T., Bernardos, R., Freeman, M.** (2012). Analysis of glial cell development and function in *Drosophila*. *Cold Spring Harb. Protoc.* **1**: 1–17
- Sustar, A., Bonvin, M., Schubiger, M., Schubiger, G.** (2011). *Drosophila* twin spot clones reveal cell di-

- vision dynamics in regenerating imaginal discs. *Dev. Biol.* **356**, 576–587.
- Takatsu, Y., Nakamura, M., Stapleton, M., et al.** (2000). TAK1 participates in c-Jun N-terminal kinase signaling during *Drosophila* development. *Molecular and Cellular Biology* **20**(9), pp. 3015–3026.
- Tavares, L., Correia, A., Santos, M.A., Relvas, J.B., Pereira, P.S.** (2017). dMyc is required in retinal progenitors to prevent JNK-mediated retinal glial activation. *PLoS Genet.* **13**, e1006647.
- Thompson, K. K., Tsirka, S. E.** (2017). The Diverse Roles of Microglia in the Neurodegenerative Aspects of Central Nervous System (CNS) Autoimmunity. *Int. J. Mol.* **18**(504): 2-15.
- Treisman, J. E.** (2013). Retinal differentiation in *Drosophila*. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2**(4): 545–557.
- Tsachaki, M., Sprecher, S. G.** (2012). Genetic and developmental mechanisms underlying the formation of the *Drosophila* compound eye. *Dev. Dynamics.* **241**(40): 40-56.
- Walton, M., Connor, B., Lawlor, P., Young, D., Sirimanne, E., Gluckman, P., Cole, G., Dragunow, M.** (1999). Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **29**, 137–168.
- Wang, J., Cao, J., Dickson, A.L., Poss, K.D.** (2015). Epicardial regeneration is guided by cardiac outflow tract and Hedgehog signalling. *Nature* **522**, 226–230.
- Wehner, D., Weidinger, G.** (2015). Signaling networks organizing regenerative growth of the zebrafish fin. *Trends Genet.* **31**, 336–343.
- White, K., Tahaoglu, E., Steller, H.** (1996). Cell killing by the *Drosophila* gene reaper. *Science* **271**, 805–807.
- Wing, J.P., Schreader, B.A., Yokokura, T., Wang, Y., Andrews, P.S., Huseinovic, N., Dong, C.K., Ogdahl, J.L., Schwartz, L.M., White, K., et al.** (2002). *Drosophila* Morgue is an F box/ubiquitin conjugase domain protein important for grim-reaper mediated apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **4**, 451–456.
- Wolff, T., Ready, D. F.** (1991). The beginning of pattern formation in the *Drosophila* compound eye: the morphogenetic furrow and the second mitotic wave. *Development.* **113**: 841-850.
- Wolpert, L., Jessell, T.M., Lawrence P et al.** (2006). *Principles of Development*. 3a ed. Oxford University Press. 720p
- Worley, M. I., Setiawan, L., Hariharan, I. K.** (2012). Regeneration and transdetermination in *Drosophila* imaginal discs. *Annu. Rev. Genet.* **46**: 289-310.
- Xiong, X., Wang, X., Ewanek, R., Bhat, P., Diantonio, A., Collins, C.A.** (2010). Protein turnover of the

BIBLIOGRAFÍA.

- Wallenda/DLK kinase regulates a retrograde response to axonal injury. *J. Cell Biol.* **191**, 211–223.
- Xu, T., Rubin G. M.** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development*. **117**(4): 1223–1237.
- Yam, P.T., Charron, F.** (2013). Signaling mechanisms of non-conventional axon guidance cues: the Shh, BMP and Wnt morphogens. *Curr. Opin. Neurobiol.* **23**, 965–973.
- Yam, P.T., Langlois, S.D., Morin, S., Charron, F.** (2009). Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* **62**, 349–362.
- Yoo, S.J., Huh, J.R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S.L., Feldman, R.M.R., Clem, R.J., Müller, H.-A.J., Hay, B.A.** (2002). Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat. Cell Biol.* **4**, 416–424.
- Yoshida, S., Soustelle, L., Giangrande, A., Umetsu, D., Murakami, S., Yasugi, T., Awasaki, T., Ito, K., Sato, M., Tabata, T.** (2005). DPP signaling controls development of the lamina glia required for retinal axon targeting in the visual system of *Drosophila*. *Development* **132**, 4587–4598.
- Yuva-Aydemir, Y., Bauke, A.-C., Klämbt, C.** (2011). Spinster controls Dpp signaling during glial migration in the *Drosophila* eye. *J. Neurosci.* **31**, 7005–7015.

ANEXO I

°C	Grados centígrados
LNA	Límite Neurogénico Anterior
Act	<i>actina</i>
BDSC	<i>Bloomington Drosophila Stock Center</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DSHB	<i>Developmental Studies Hybridoma bank</i>
ARN	Ácido ribonucleico
TS	termo-sensible
tub	<i>tubulina</i>
UAS	<i>Upstream Activating Secuencias</i>
ARNi	ARN de interferencia
LacZ/βgal	β-Galactosidasa
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>